

Partnererkennung und Inkorporation des Photobionten bei der Pilz-Endocyanose *Geosiphon pyriformis*

vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt
genehmigte

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Dipl. Biol. Elke Wolf
aus Wadern

Berichterstatter: Prof. Dr. M. Kluge
Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Ullrich
Eingereicht am: 19.12.02
Mündliche Prüfung: 31.01.03

Darmstadt 2003

D17

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Botanik der Technischen Universität Darmstadt unter der Leitung von Dr. A. Schüßler in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Kluge durchgeführt. Im Rahmen des Graduiertenkollegs 340 "Kommunikation in biologischen Systemen: vom Molekül zum Organismus in seiner Umwelt" wurde die Arbeit von der DFG gefördert.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1 Einleitung	3
1.1 <i>GEOSIPHON PYRIFORMIS</i>	3
1.2 <i>NOSTOC PUNCTIFORME</i> (KÜTZ.) HARIOT, STAMM 1:1-26	6
1.3 ERKENNUNGSREAKTIONEN	7
1.4 ZIEL DER ARBEIT	9
2 Material und allgemeine Methoden	11
2.1 MATERIAL	11
2.1.1 Pflanzenmaterial	11
2.1.2 Mikroskopie	11
2.1.3 Fluoreszenzmarkierung und Zucker-Sättigung	12
2.1.3.1 Fluoreszenzmarkierte Lektine	12
2.1.3.2 Zucker und Mucin	12
2.1.4 Auswertung und Dokumentation	13
2.2 KULTURMETHODEN	14
2.2.1 Kultur von <i>Geosiphon pyriformis</i>	14
2.2.1.1 <i>Geosiphon</i> -Medium	15
2.2.2 Präparation von <i>Geosiphon</i> -Blasen	16
2.2.3 Kultur von <i>Nostoc punctiforme</i>	18
2.3 BELEUCHTUNGSMETHODEN	19
2.3.1 Transmissionsspektren der verwendeten Lichtfilter	19
2.3.2 Rot-Grün-Synchronisation	21
2.4 METHODEN ZUR LEBENDBEOBACHTUNG AM MIKROSKOP	22
2.4.1 Filtereinsatzkammern	23
2.5 CONFOKALE LASER SCANNING MIKROSKOPIE (CLSM)	25
2.5.1 Das Prinzip der confokalen Laser Scanning Mikroskopie	25
2.5.2 Anwendung der confokalen Technik	27
3 Synchronisation und Charakterisierung der Stadien im Lebenszyklus von <i>Nostoc punctiforme</i>	28
3.1 SYNCHRONISATION DES LEBENSZYKLUS	28
3.1.1 Reaktion von Hormogonien auf verschiedene Lichtqualitäten	29
3.1.1.1 Methode	29
3.1.1.2 Ergebnisse	30
3.1.2 Rot-Grün-Synchronisation des Primordienstadiums	34

3.1.2.1	Methode	34
3.1.2.2	Ergebnisse	35
3.1.3	Diskussion	38
3.2	LEKTIN-MARKIERUNG LEBENDER CYANOBAKTERIEN	41
3.2.1	Methode	41
3.2.2	Ergebnisse	42
3.2.3	Diskussion	44
4	Partnererkennung und Inkorporation	45
4.1	SÄTTIGUNGSEXPERIMENTE	45
4.1.1	Einführung	45
4.1.2	Methode	46
4.1.3	Ergebnisse	46
4.1.4	Diskussion	51
4.2	PARTNERERKENNUNG UND INKORPORATION VON <i>Nostoc</i>	55
4.2.1	Methode	55
4.2.2	Erste Erkennungsstadien im Lichtmikroskop	56
4.2.3	Erkennungsstadien im CLSM	58
4.2.3.1	ConA-Alexa TM 488-Färbung	59
4.2.3.2	Mucin-Oregon Green [®] 488-Färbung	64
4.2.4	Der Inkorporationsprozess	67
4.2.5	Diskussion	72
4.2.5.1	Methodik	72
4.2.5.2	Das Symbiose-kompetente <i>Nostoc</i> -Stadium	73
4.2.5.3	Fluoreszenzmarkierung	74
4.2.5.4	Der Inkorporationsprozess	75
4.2.5.5	Auswirkungen der Inkorporation auf <i>Nostoc</i>	76
5	Messung von Fluoreszenzspektren mit dem CLSM bei freilebendem und symbiotischem <i>Nostoc punctiforme</i>, Stamm 1:1-26 (69.79 SAG)	78
5.1	EINFÜHRUNG	78
5.1.1	Ziel der Untersuchung	78
5.1.2	Phycobiliproteine und Phycobilisomen	78
5.2	MATERIAL UND METHODE	82
5.2.1	Versuchsaufbau	82
5.2.2	Messung der Fluoreszenzspektren	82
5.2.3	Berechnung von Überlagerungsspektren aus Einzelspektren	84
5.3	ERGEBNISSE	88
5.3.1	Fluoreszenzspektren im Lebenszyklus von <i>Nostoc punctiforme</i>	88

5.3.1.1	Einführung	88
5.3.1.2	Charakterisierung der beiden <i>Nostoc</i> -Typen in der Mischkultur	88
5.3.1.3	Fluoreszenzspektren dunkelgrüner <i>Nostoc</i> -Zellen im Verlauf des Lebenszyklus	91
5.3.1.4	Fluoreszenzspektren hellgrüner <i>Nostoc</i> -Zellen im Verlauf des Lebenszyklus	94
5.3.1.5	Fluoreszenzspektren von endosymbiotischem <i>Nostoc punctiforme</i>	96
5.3.2	Chromatische Adaptation	98
5.3.2.1	Einführung	98
5.3.2.2	Ergebnisse der Versuche mit freilebenden <i>Nostoc</i>	98
5.3.2.3	Ergebnisse der Versuche mit endosymbiotischem <i>Nostoc</i> in <i>Geosiphon</i> -Blasen	101
5.3.3	Anteile der einzelnen Pigmentfluoreszenzen am Überlagerungsspektrum	103
5.3.3.1	Einführung	103
5.3.3.2	Ergebnisse	103
5.4	DISKUSSION	108
5.4.1	Methodik	108
5.4.2	Charakterisierung des bisher unbekannten <i>Nostoc</i> -Typs	109
5.4.3	Anteile der einzelnen Pigmentfluoreszenzen am Überlagerungsspektrum	110
5.4.4	Änderung des Fluoreszenzspektrums im Lebenszyklus von <i>Nostoc</i>	112
5.4.5	Chromatische Adaptation	113
5.4.6	Fluoreszenzspektren endosymbiotischer <i>Nostoc</i> -Zellen	114
6	Abschließende Diskussion	115
7	Literaturverzeichnis	120
8	Anhang	126
8.1	FLUORESZENZSPEKTREN	126
8.2	ABSCHÄTZUNG DER LEISTUNG DES LASERS UND DER PPFD IN DER OBJEKTEBENE	130
	Abkürzungen	131
	Danksagungen	132
	Lebenslauf	133
	Eidesstattliche Erklärung	135

Zusammenfassung

Die *Geosiphon*-Symbiose ist die einzige bekannte Endosymbiose eines Pilzes mit Cyanobakterien. Diese Symbiose wird bei der Bildung jeder einzelnen *Geosiphon*-Blase von neuem durch die Inkorporation eines zuvor freilebenden Cyanobakterien-Filamentes (*Nostoc punctiforme*) in eine Pilzhyphe etabliert. Die Erkennung der Symbiosepartner und der Inkorporationsprozess wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Zur Beobachtung der Symbiose wurden spezielle Filtereinsatzkammern mit Deckglasboden und Zellkultur-Filtereinsatz (Millipore) entwickelt. Mit diesem System konnten die Organismen 2 bis 3 Wochen kultiviert und sowohl mit konventioneller Lichtmikroskopie als auch mit confokaler Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) untersucht werden.

Der Prozess der Inkorporation von *Nostoc*-Zellen in die Pilzhyphe dauerte etwa 1,5 bis 2 Tage. In weiteren 2,5 bis 3,5 Tagen bildete sich durch Anschwellen der Pilzhyphe mit den eingeschlossenen Cyanobakterien eine junge *Geosiphon*-Blase aus. Die *Nostoc*-Zellen wurden während der Inkorporation stark deformiert und verloren teilweise ihre Pigmentfluoreszenz. Innerhalb von 1 bis 2 Tagen regenerierten sie sich und passten sich dem Leben in der Symbiose an. Die Symbiose scheint unter diesen Bedingungen vorteilhaft für die Cyanobakterien zu sein. Sie erreichten innerhalb der ersten 5 Tage nicht nur etwa das 6-fache Volumen sondern auch die 3- bis 4-fache Zellteilungsrate und damit etwa das 30- bis 40-fache Biomasse-Volumen der freilebenden Zellen.

Die Stadien des *Nostoc*-Lebenszyklus wurden durch ein Beleuchtungsprogramm mit Rot- und Grünlicht zeitweise synchronisiert. Dadurch konnte das erkenntungsbereite *Nostoc*-Stadium charakterisiert und gezielt induziert und untersucht werden. Rotlichtinduzierte Hormogonien verloren nach 3 bis 7 Stunden im Grünlicht ihre Bewegungsfähigkeit und begannen mit der synchronen Weiterentwicklung zu Primordien und vegetativen Stadien. Lektin-Markierungsstudien zeigten, dass ein Mannose-haltiges Glykokonjugat im Hüllschleim der *Nostoc*-Filamente ebenfalls nach 3 bis 7 Stunden auftritt. Erste mikroskopisch sichtbare Pilzstrukturen einer beginnenden Inkorporation traten nach 8 bis 9 Stunden im Grünlicht auf, die eigentliche Erkennung musste also bereits vorher stattgefunden haben. Dies bedeutet, dass die Erkennung der *Nostoc*-Zellen bereits kurz nach dem Verlust der Bewegungsfähigkeit beginnt. Das Mannose-haltige Glykokonjugat war auch bei sehr frühen Erkennungsstadien bereits im Hüllschleim vorhanden.

Mit spektraler CLSM konnten Fluoreszenzspektren einzelner *Nostoc*-Zellen analysiert werden. Die gemessenen Fluoreszenzspektren stellen Überlagerungsspektren der einzelnen Pigmentfluoreszenzen dar. Die Anteile der beteiligten Pigmentfluoreszenzen konnten durch nichtlineare Regressionsberechnung von Bestkurven ermittelt werden. Im Lebenszyklus von *Nostoc* fand eine Verschiebung des Hauptmaximums von 674 nm bei Hormogonien zu

654 nm bei vegetativen Zellen statt. Außerdem bildete sich ein zweites Maximum von 576 nm bei vegetativen Stadien aus. Diese Verschiebung wurde nicht durch chromatische Adaptation an die unterschiedlichen Lichtqualitäten des Beleuchtungsprogramms ausgelöst. Das Fluoreszenzspektrum von endosymbiotischem *Nostoc* und von *Nostoc*-Zellen während des Inkorporationsprozesses unterschied sich qualitativ nicht von dem freilebender vegetativer Stadien.

Die Bewegungsunfähigkeit, das Mannose-haltige Glykokonjugat in der Schleimhülle und das für vegetative Stadien typische Fluoreszenzspektrum können damit als Marker für das Symbiose-kompetente *Nostoc*-Stadium dienen.

Durch die Analyse der Fluoreszenzspektren konnte ein in der Kultur der Cyanobakterien aufgetretener, bisher unbekannter *Nostoc*-Stamm - möglicherweise eine Mutante - identifiziert werden. Vegetative Zellen dieses Stammes sind durch die Lokalisation des Hauptfluoreszenzsignals im Zellinnern und durch das Hauptmaximum des Fluoreszenzspektrums bei 576 nm charakterisiert. Die Inkorporation solcher *Nostoc*-Zellen führte zur Bildung hellgrüner *Geosiphon*-Blasen, deren Fluoreszenzmaximum ebenfalls bei 576 nm lag.

Zur Untersuchung des Mechanismus der Partnererkennung wurden Zucker-Sättigungsexperimente durchgeführt. Da das Mannose-haltige Glykokonjugat genau in dem Zeitbereich auftrat, in dem erste Erkennungsreaktionen stattfanden, könnte es ein direktes Erkennungssignal darstellen. Die Zugabe von Methyl- α -D-Glucopyranosid und Methyl- α -D-Mannopyranosid oder dem Lektin ConA zum Medium hatte jedoch wie einige weitere Mono- und Disaccharide keinen Einfluss auf die Partnererkennung und die Bildung neuer Blasen. In Anwesenheit von Galactose, Lactose und Mucin war die Anzahl neuer Blasen dagegen signifikant geringer. Da bei Zugabe von Melibiose keine Hemmung der Partnererkennung auftrat, wird der Aufnahmeprozess möglicherweise durch Galactose in einer bestimmten Konfiguration – wahrscheinlich β -1,4 gebunden – vermittelt. Eine solche Konfigurationsabhängige Hemmung spricht für einen Lektin-vermittelten Mechanismus der spezifischen Partnererkennung bei der *Geosiphon*-Symbiose.

1 Einleitung

1.1 *GEOSIPHON PYRIFORMIS*

Die *Geosiphon*-Symbiose ist bisher die einzige bekannte Endosymbiose eines Pilzes mit einem Cyanobakterium. Diese Symbiose steht damit in völligem Gegensatz zu den Exosymbiosen der Flechten wie z.B. *Peltigera* oder *Collema*. Der obligat symbiotische Pilzpartner *Geosiphon pyriformis* bildet ein syncytiales Myzel an der Oberfläche von feuchtem, Nährstoff- (v.a. Phosphat-) armem Boden bis zu einer Tiefe von etwa 2-3 cm (Schüßler, 1995). An der Bodenoberfläche bilden sich coenocytische, 1-2 mm lange, blasenförmige Pilzstrukturen aus, die durch die darin endosymbiotisch lebenden Cyanobakterien fast schwarz gefärbt sind (Abb. 1.1). Die Cyanobakterien befinden sich innerhalb dieser Blasen in einem vom Pilz gebildeten Kompartiment, dem Symbiosom, das peripher im oberen Teil entlang der Blasenwand angeordnet ist (zur Struktur siehe Schüßler und Kluge, 2001). Der basale, normalerweise von Erde umgebene Teil der Blase ist meist durch Ansammlung von Fetttropfchen weiß gefärbt. Der Pilz bildet als Dauerorgane weißliche Sporen mit einem Durchmesser von etwa 250 µm aus. Sowohl aus den Sporen als auch aus den *Geosiphon*-Blasen können neue Hyphen auskeimen. Trifft eine wachsende Pilzhyphe auf ein freilebendes *Nostoc*-Filament, kann dieses in die Hyphe inkorporiert werden. Wenn das *Nostoc*-Filament vollständig von Pilzmaterial umgeben ist, schwillt die Hyphenspitze zu einer neuen, birnenförmigen (*pyriforme*) Blase an. Bei der Inkorporation stehen die *Nostoc*-Zellen zunächst unter Stress, passen sich dann aber an das Leben in der Symbiose an. Sie erreichen ein Vielfaches des Volumens der freilebenden *Nostoc*-Zellen, unterscheiden sich in ihrer Ultrastruktur aber nicht prinzipiell von ihnen (Schüßler und Kluge, 2001). Die Zellen teilen sich innerhalb der Blase und bilden genau wie die freilebenden Cyanobakterien in regelmäßigen Abständen die zur Stickstofffixierung spezialisierten Heterocysten aus. In der Symbiose findet sowohl Photosynthese als auch Stickstoff-Fixierung statt (Kluge et al., 1991; 1992).

Jede einzelne *Geosiphon*-Blase entsteht durch die Aufnahme eines neuen, bis zu diesem Zeitpunkt freilebenden *Nostoc*-Filamentes in eine Pilzhyphe. Dabei werden allerdings nur *Nostoc*-Filamente in einem bestimmten Stadium ihres Lebenszyklus vom Pilz erkannt und inkorporiert und Heterocysten werden bei der Inkorporation ausgeschlossen (Kluge et al., 1994; Mollenhauer et al., 1996). Zur Etablierung der Symbiose ist somit ein spezifischer Erkennungsmechanismus notwendig. Dabei findet nicht nur eine Unterscheidung zwischen "kompatiblen" und "nicht-kompatiblen" Cyanobakterien-Stämmen (Mollenhauer und Mollenhauer, 1996), sondern auch zwischen "kompetenten" und "nicht-kompetenten" Lebensstadien der Cyanobakterien eines Stammes statt (Mollenhauer et al., 1996).

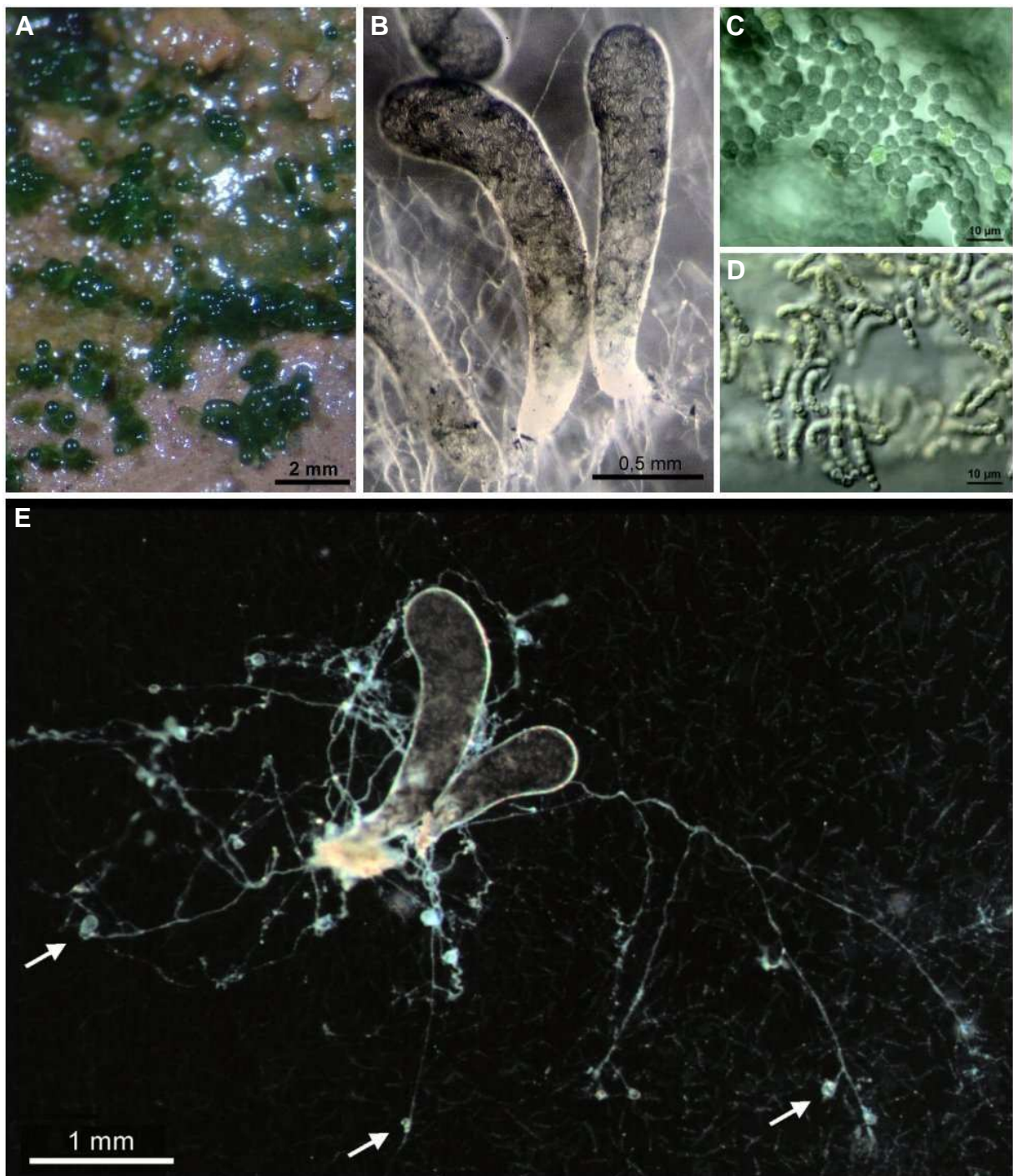


Abb. 1.1: **A:** *Geosiphon*-Blasen in einer Erdkultur. **B:** Präparierte *Geosiphon*-Blasen. Die *Nostoc*-Filamente innerhalb der Blasen sind zu erkennen. **C:** Endosymbiotisch lebende *Nostoc*-Zellen mit Heterocysten (Pfeile) innerhalb einer *Geosiphon*-Blase. **D:** freilebende vegetative Filamente von *Nostoc punctiforme* Stamm 1:1-26. **E:** *Geosiphon*-Blasen mit ausgekeimten Hyphen, an denen durch die Aufnahme jeweils eines *Nostoc*-Filamentes neue junge Blasen (Pfeile) entstanden sind.

Bisher sind in der Literatur nur wenige Standorte der *Geosiphon*-Symbiose in Deutschland (bei Nordhausen, Kützing 1849; bei Bautzen, Schorler 1916; bei Göttingen, von Wettstein 1926, Knapp 1933; bei Marburg, Schnepf 1964; bei Bieber/Spessart, Mollenhauer 1968 bis heute) und in Österreich (bei Kremsmünster, von Wettstein 1913) beschrieben worden. Zurzeit ist allerdings nur ein einziger Standort bei Bieber im Spessart in der Nähe der Außenstelle Lochmühle des Forschungsinstituts Senckenberg bekannt. *Geosiphon* wurde immer auf feuchten, nährstoffarmen Böden in der Pflanzengesellschaft des Centunculo-Anthocerotetum WALO KOCH 1926 (Mollenhauer, 1988) mit den typischen Bryophyten der Gattungen *Anthoceros*, *Dicranella*, *Riccia* und *Fossombronia* gefunden. Schüßler (1995) zeigte, dass für die erfolgreiche Etablierung der Symbiose in der Kultur eine geringe Phosphatkonzentration des Nährmediums (bis max. 10 µM) Voraussetzung ist, während die Nitratkonzentration keinen Einfluss zeigte.

Entdeckt und erstmals beschrieben wurde der Organismus 1849 von Kützing als *Botrydium pyriforme*, eine siphonale Alge der Gattung *Botrydium*. Von Wettstein (1915) erkannte die Endosymbiose mit *Nostoc*, fand "weiße Dauerorgane" der "Alge" und einen Hinweis auf Chitin in der Zellwand. Knapp (1933) erkannte, dass der Symbiose-Partner der Cyanobakterien ein Pilz ist, dokumentierte fotografisch die Aufnahme eines Cyanobakteriums in eine Pilzhyphe und beschrieb die Entstehung einer neuen Blase. Schnepf führte 1964 erste Ultrastruktur-Untersuchungen an *Geosiphon* durch und entwickelte anhand dieser Studien die bekannte Kompartimentierungsregel der Eukaryoten. D. und R. Mollenhauer (1988) gelang die Etablierung einer Laborkultur. Darauf folgten Studien zur photosynthetischen CO₂-Fixierung (Kluge et al., 1991) und zur Stickstofffixierung der Symbiose (Kluge et al., 1992). Der Vorgang der Inkorporation wurde von Mollenhauer et al. (1996) untersucht, allerdings ohne eine genaue zeitliche Zuordnung der inkorporierten *Nostoc*-Stadien und der Blasenentwicklung. Elektronenmikroskopische (Schüßler et al., 1994) und molekularbiologische Untersuchungen (Gehrig et al., 1996) zeigten die aufgrund der Sporen-morphologie erstmals von Mollenhauer (1992) vermutete Verwandtschaft von *Geosiphon* mit den arbuskulären Mykorrhiza (AM)-Pilzen.

AM-Pilze sind wie *Geosiphon* obligate Symbionten, die Endosymbiosen mit den Wurzeln von etwa 80-90 % der Landpflanzen eingehen (Smith S.E. and Read D.J., 1997). Die Pilzhypen penetrieren dabei die Rindenzellen der Pflanzenwurzeln und bilden intrazelluläre Arbuskeln, bäumchenartige Strukturen, aus. Die AM-Symbiose ist auf den ersten Blick völlig anders aufgebaut als die *Geosiphon*-Symbiose: AM-Pilze gehen Symbiosen mit Pflanzenwurzeln ein, wobei die Pilzhypen endosymbiotisch innerhalb der Pflanzenzellen leben. *Geosiphon* geht dagegen eine Symbiose mit Cyanobakterien ein, die endosymbiotisch innerhalb des Pilzes leben. Obwohl also Makro- und Mikrobiont bei den beiden Symbiosen vertauscht sind, zeigten Untersuchungen von Schüßler et al. (1994, 1996) ultrastrukturelle und funktionelle

Ähnlichkeiten zwischen der *Geosiphon*- und der AM-Symbiose. Die AM-Pilze wurden damals noch in die Ordnung der Glomales gestellt und den Zygomyceten zugerechnet. Eine von Kluge et al. (2002) vermutete AM-artige Assoziation von *Geosiphon* mit Pflanzenwurzeln oder mit den vergesellschafteten Moosen wurde allerdings bisher noch nicht beobachtet. Detaillierte phylogenetische Analysen von Schüßler et al. (2001a, b) und Schwarzott et al. (2001) belegen die phylogenetische Zugehörigkeit des Pilzpartners der *Geosiphon*-Symbiose zur Verwandtschaft der AM-Pilze und führten zur Neustrukturierung der Zygomyceten-Taxonomie (Übersicht in Schüßler et al., 2002). Schüßler et al. (2001b) stellten *Geosiphon* zusammen mit den AM-Pilzen in ein neues, monophyletisches Phylum, die Glomeromycota WALKER & SCHÜßLER mit der einzigen Klasse Glomeromycetes und den 4 Ordnungen Paraglomerales, Archaeosporales (zu der auch *Geosiphon* gehört), Glomerales und Diversisporales (Schüßler et al., 2001b). Der Artname *Geosiphon pyriformis* (früher *G. pyriforme*) gilt nach der neuen Taxonomie nur für den Pilzpartner und nicht für die Symbiose, da diese nicht zu den Flechten gerechnet werden sollte (Schüßler 2002).

1.2 *NOSTOC PUNCTIFORME* (KÜTZ.) HARIOT, STAMM 1:1-26

Nachdem von Wettstein (1915) die endosymbiotischen Cyanobakterien als eigene Art mit dem Namen *Nostoc symbioticum* beschrieb, erkannte Knapp (1933), dass jede neue *Geosiphon*-Blase durch Aufnahme eines zuvor freilebenden *Nostoc*-Filamentes in eine Pilzhyphe entsteht und es sich somit nicht um einen ausschließlich symbiotisch lebenden *Nostoc*-Stamm handelt. Die Taxonomie der Cyanobakterien ist wegen der wenigen zur Verfügung stehenden morphologischen Merkmale kontrovers; eine umfassende phylogenetische Systematik fehlt bisher. Mollenhauer isolierte einen *Nostoc*-Stamm aus *Geosiphon*-Blasen und beschrieb ihn als *Nostoc punctiforme* (Kütz.) Hariot Stamm 1:1-26 FIS (Mollenhauer, 1992; Mollenhauer et al., 1996).

Freilebende *Nostoc punctiforme* Stämme bilden im vegetativen Stadium kleine Kolonien aus fadenförmigen Zellketten, die in eine dicke Polysaccharidschicht eingebettet sind. In diesem Stadium haben die Zellen bei einer Größe von ca. 3 - 4 µm eine kugelige bis ovale Form. Bei Stickstoffmangel differenzieren sich interkalare Heterocysten zur Stickstofffixierung. Cyanobakterien der Gattung *Nostoc* durchlaufen einen charakteristischen Lebenszyklus. Durch Änderung der Umweltbedingungen (z.B. Regen) kann die Bildung von Hormogonien, beweglichen Filamenten, induziert werden, deren Zellen kleiner (2-3 µm) und zylindrisch geformt sind. Als Auslöser für die Bildung von Hormogonien wird bei Cyanobakterien in der Kultur insbesondere der Transfer in frisches Medium (Herdman und Rippka, 1988) sowie die Beleuchtungsqualität genannt; für einige Cyanobakterien können aber auch die Verfügbarkeit von Stickstoff, Eisen oder Phosphor und osmotische Effekte eine Rolle spielen (Tandeau de Marsac, 1994). Hormogonien können sich durch die Sekretion eines speziellen Bewegungs-

schleims aus ringförmig angeordneten Reihen von Porenkomplexen (JPC, junctional pore complex) fortbewegen (Hoiczyk & Baumeister, 1998). Wenn die Hormogonien ihre Bewegungsfähigkeit verlieren, beginnt das Primordien-Stadium, welches alle Übergangsstadien zwischen beweglichen Hormogonien und teilungsaktiven, vegetativen Filamenten umfasst (Mollenhauer et al., 1994). In diesem Stadium beginnen die Zellen zu wachsen, eine neue Polysaccharid-Hülle wird ausgebildet und bei Stickstoff-Mangel beginnt auch die Differenzierung von Heterocysten. Bei dieser Entwicklung tritt ein typisches "Zickzack-Stadium" auf, das durch Verschiebungen der wachsenden Zellen, die sich aber noch nicht teilen, innerhalb der Schleimhülle zustande kommt. Nach der erneuten Aufnahme der Zellteilungsaktivität entwickeln sich wieder vegetative Filamente. Der Lebenszyklus von *Nostoc* ist in Abb. 3.8 schematisch dargestellt. Die einzelnen Stadien wurden von Schüßler et al. (1997) mikroskopisch dokumentiert.

1.3 ERKENNUNGSREAKTIONEN

Symbiosen sind enge Lebensgemeinschaften artverschiedener Organismen zum zumindest zeitweise beiderseitigen Nutzen (de Bary, 1879). Spezifische Erkennungsmechanismen zur Etablierung der Symbiose sind vor allem für obligat symbiotische Organismen von überlebenswichtiger Bedeutung. Über die Mechanismen, die einer Partnererkennung, wie sie bei *Geosiphon* stattfindet, zugrundeliegen, ist allerdings erst sehr wenig bekannt. Mechanismen zur Zell-Zell-Erkennung spielen nicht nur bei der symbiotischen Partnererkennung, sondern auch bei verschiedenen anderen Reaktionen wie z.B. bei der Pathogen-Wirt-Interaktion, der Immunabwehr oder der Fertilisation eine wichtige Rolle. Auch hier sind die Mechanismen der Erkennung zum großen Teil noch unbekannt. Eine Beteiligung von Lektinen (Proteine, die spezifisch Mono- und Oligosaccharide binden, aber keine Enzymfunktion haben oder Antikörper sind; Rüdiger, 1998) und Oligosacchariden oder Glykoproteinen als Vermittler von Erkennungsreaktionen wird allerdings sowohl bei tierischen als auch bei pflanzlichen Zell-Zell Interaktionen diskutiert (Sharon und Lis, 1989; John et al, 1997; Chatterjee and Ahmed, 1998; Kaltner und Stierstorfer, 1998; Villalobo und Gabius, 1998). Die natürlichen Funktionen der bei Pflanzen u.a. in Vorratsorganen in größeren Mengen vorkommenden Lektine sind noch weitgehend unbekannt (Rüdiger, 1998).

Die vielfältigen Möglichkeiten, die sich durch die Verwendung von Oligo- und Polysacchariden als Signalmoleküle ergeben, sind erst in den letzten Jahren eingehender untersucht worden. Durch die Verwendung von Oligosacchariden als Signalstrukturen kann eine sehr hohe Spezifität der Erkennung erreicht werden. Das größere Potential der Zuckerbindungen ergibt sich aus der Möglichkeit, im Gegensatz zu Proteinen oder DNA mehrere Arten der Bindung zwischen zwei Kohlehydratmolekülen zu verwirklichen. Dadurch kann zusätzlich auch die Bildung von Seitenketten erfolgen (Gabius, 2000). Zur

Entschlüsselung eines solchen "Zucker-Codes" sind Lektine geeignet, die entsprechend ihrer Bindungsspezifität auch zwischen Konformeren unterscheiden können (Solís et al., 2001). Nachgewiesen ist eine Beteiligung von Glykokonjugaten und Lektinen an Erkennungsreaktionen auf zellulärer Ebene aber nur in wenigen Fällen.

Für tierische Zellen sind verschiedene Molekülklassen und ihre Bindungsmechanismen bekannt, die eine Funktion bei der Zelladhäsion besitzen (Alberts, 1994). Dabei können auch verschiedene Moleküle zusammenwirken, wie z.B. bei der Leukozyten-Adhäsion an der Blutgefäßwand, bei der sowohl Protein-Protein-Interaktionen als auch Protein-Kohlenhydrat-Kontakte eine wichtige Rolle spielen (Kaltner & Stierstorfer, 1998). Zur speziesspezifischen Erkennung bei der Fertilisation wurden bereits unterschiedliche Mechanismen gefunden. Die Fertilisation bei Mollusken erfolgt beispielsweise durch die speziesspezifische Bindung eines Proteins (Kresge, 2001), während bei Säugern der Oligosaccharid-Anteil eines Glykoproteins der Eizelle für die Erkennung der Spermien essentiell ist (Wassarman & Litscher, 2001).

Zu Erkennungsreaktionen bei tierischen Symbiosen liegen nur wenige Studien vor. Bei der Symbiose der Seeanemone mit Zooxantellen wurden Oberflächenglykoproteine isoliert, die an der Erkennungsreaktion beteiligt sind (Lin, 2000). Studien zur Symbiose von Leuchtbakterien (*Vibrio fischeri*) mit dem Tintenfisch (*Euprymna*) zeigten, dass viele Bakterienarten in einer Schleimschicht vor dem Leuchtorgan aggregieren. Der Mechanismus, der dafür sorgt, dass dann ausschließlich *Vibrio* in das Leuchtorgan einwandern kann, konnte allerdings noch nicht geklärt werden (Hirsch & McFall-Ngai, 2000).

Zu den Mechanismen der Zell-Zell Erkennung bei Pflanzen gibt es ebenfalls erst wenige Studien. Kim und Kim gelang 1999 durch Sättigungsexperimente mit Monosacchariden und Lektinen sowie anhand von CLSM-Beobachtungen der Nachweis einer zuckervermittelten Bindung der Gameten der Rotalge *Aglaothamnion oosumiense* (Ceramiales, Rhodophyta).

Die Symbiose von Rhizobien mit Wurzeln der Leguminosen ist die bisher am besten untersuchte Pflanzensymbiose. Hier sind bereits mehrere Faktoren bekannt, die an der erfolgreichen Etablierung der Symbiose beteiligt sind (Crespi und Gálvez, 2000; Hirsch et al., 2001; Hirsch, 1999). So wirken Flavonoide der Pflanzen zunächst als chemotaktisches Signal für die Rhizobien und regen die Bildung der bakteriellen Nod-Faktoren an. Die Nod-Faktoren sind nicht nur essentiell für eine Nodulation, sondern auch an der Kontrolle der Wirtsspezifität beteiligt (Hirsch et al. 2001). Wie in Experimenten mit transgenen Pflanzen gezeigt wurde (Díaz et al., 1989; van Rhijn et al., 1998), sind am Erkennungsmechanismus zwischen Wirtspflanze und Bakterium auch pflanzliche Lektine beteiligt, ihre Bindungspartner sind allerdings ebenso wie die der Nod-Faktoren noch nicht bekannt.

Auch für andere Symbiosen von Cyanobakterien mit höheren Pflanzen wie *Gunnera* oder dem Hornmoos *Anthoceros* gibt es nur wenige Hinweise auf den Mechanismus der Erkennung. So wird sowohl von *Gunnera* als auch von *Anthoceros* über das Vorhandensein

eines Hormogonien induzierenden Signals berichtet (Campbell und Meeks, 1989; Bergman et al., 1996; Adams, 2000). Der Schleim der Drüsen am Stamm von *Gunnera*, die von *Nostoc* besiedelt werden, enthält weitere Substanzen, die die Genexpression der Cyanobakterien beeinflussen und ihr Wachstum anregen. Ihre Natur ist jedoch unbekannt. Ähnlichkeiten der *nod*-Gene der Rhizobien mit Gensequenzen Symbiose-kompetenter Cyanobakterienstämme weisen auf einen möglicherweise ähnlichen Kommunikationsmechanismus hin.

Bei der arbuskulären Mykorrhiza gibt es verschiedene Phasen der Infektion, die möglicherweise durch verschiedene Faktoren und Signale ausgelöst werden (Giovannetti und Sbrana, 1998). Die Natur der notwendigen Erkennungssignale für die verschiedenen Stadien der Infektion ist allerdings noch völlig unbekannt. Pflanzenexsudate fördern das Wachstum der Pilzhypen, reichen aber als Signal zu Bildung von Appressorien nicht aus (Harrison, 1997; 2001). Einige Flavonoide fördern die Sporenkeimung und das Hyphenwachstum, allerdings werden auch Pflanzenmutanten, die keine Flavonoide produzieren, mykorrhiziert (Bécard et al., 1995). Für die Bildung des Appressoriums scheint die Struktur der Zellwand ein Signal darzustellen, der Mechanismus zur Penetration der Hyphen in die Wirtszellen ist jedoch nicht geklärt (Harrison, 2001).

Die *Geosiphon*-Symbiose ist im Gegensatz zur Symbiose der AM-Pilze für mikroskopische und physiologische Studien sehr gut zugänglich. Da die eukaryotische RNA des Pilzes durch die Poly-A-Sequenz gut von der prokaryotischen RNA des Cyanobakteriums getrennt werden kann, eignet sich die *Geosiphon*-Symbiose im Vergleich zur AM auch sehr gut für molekularbiologische Studien. Ob *Geosiphon* neben der Endosymbiose mit *Nostoc* auch Mykorrhiza-ähnliche Symbiosen mit Moosen oder höheren Pflanzen eingehen kann, ist zwar noch nicht geklärt, die Verwandtschaft zu den AM-Pilzen macht *Geosiphon* aber zu einem exzellenten Modellorganismus zur Untersuchung grundlegender Mechanismen der Symbiose.

1.4 ZIEL DER ARBEIT

In dieser Arbeit sollte das symbiosebereite *Nostoc*-Stadium und der Mechanismus der Partnererkennung bei der *Geosiphon*-Symbiose charakterisiert werden. Dazu sollten Methoden entwickelt werden, mit denen die Etablierung der Symbiose, die Partnererkennung und der Prozess der Inkorporation detailliert mikroskopisch untersucht werden können. Schüßler et al. (1997) zeigten, dass sich die Zusammensetzung der Glykokonjugate des Oberflächenschleims der auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten Cyanobakterien während ihres Lebenszyklus verändert und zwar in einem Stadium, das vom Pilz aufgenommen werden kann. Dies gab Anlass zu der Vermutung, dass bei der Partnererkennung bei *Geosiphon* ebenfalls Glykokonjugate und Lektine beteiligt sein könnten. Anhand von Sättigungsexperimenten mit verschiedenen Zuckern und Lektinen sollte

überprüft werden, ob Zucker oder Lektine Auswirkungen auf die Partnererkennung bei *Geosiphon* haben und damit evtl. einen Hinweis auf den Erkennungsmechanismus geben könnten. Durch Studien zur Reaktion der Cyanobakterien auf verschiedene Beleuchtungsqualitäten sollte eine Methode zur Induktion und (zumindest zeitweisen) Synchronisation des zur Erkennung fähigen *Nostoc*-Stadiums etabliert werden, um so dieses Stadium näher charakterisieren zu können. Mit dieser Methode sollte die Bildung eines Mannose-haltigen Glykokonjugats, das an der Erkennung beteiligt sein könnte, mit genauer zeitlicher Auflösung mittels fluoreszenzmarkierter Lektine am CLSM dokumentiert werden. Der Prozess der Inkorporation sollte in seinem zeitlichen Ablauf von der Erkennung bis zur vollständig entwickelten jungen Blase durch CLSM-Studien mit Lektin-markierten lebenden Organismen im Detail beobachtet und dokumentiert werden. Zur weiteren Charakterisierung des symbiosekompetenten *Nostoc*-Stadiums sowie der endosymbiotisch lebenden *Nostoc*-Zellen wurden Fluoreszenzspektren mit spektraler Laser Scanning Mikroskopie analysiert.

2 Material und allgemeine Methoden

2.1 MATERIAL

2.1.1 Pflanzenmaterial

Laborkulturen von *Geosiphon pyriformis* (Kütz. v. Wettstein) wurden ursprünglich im Labor von Prof. D. Mollenhauer (Forschungsinstitut Senckenberg, Außenstelle Lochmühle, Bieber) etabliert und 1992 als Ausgangsmaterial zum Aufbau von Kulturen in Heidelberg und Darmstadt zur Verfügung gestellt. In dieser Arbeit wurden Kulturen aus allen drei Quellen untersucht, die alle von der ursprünglichen Kultur aus Bieber abstammen. Es wurden zu Vergleichszwecken auch *Geosiphon*-Blasen im Freiland (Spessart, verschiedene Äcker nahe der Außenstelle Lochmühle) gesammelt und untersucht.

Cyanobakterien des Stammes *Nostoc punctiforme* 1:1-26 wurden von Prof. D. Mollenhauer zur Verfügung gestellt. Dieser Stamm wurde von Prof. Mollenhauer aus *Geosiphon pyriformis* isoliert und wird in der Sammlung von Algenkulturen des Pflanzenphysiologischen Instituts der Universität Göttingen (SAG) unter der Nummer 69.79 (Schlösser, 1994) und in der Kulturensammlung des Institut Pasteur (Paris) als Stamm PCC 9503 geführt (Schüßler et al, 1997). Die Versuche wurden mit 2 bis 3 Monate alten Agar-Cellophan-Kulturen (siehe Kap. 2.2.3) der Cyanobakterien durchgeführt.

2.1.2 Mikroskopie

Zur mikroskopischen Beobachtung wurden folgende Geräte verwendet:

- Stereomikroskop Leica MZ 9s
- Inversmikroskop Leica DM IRBE, Objektive: 10 × 0.3 PL FLUOTAR
40 × 0.7 PL FLUOTAR
63 × 1.32 OIL PH3 PL APO
- Confocal Laser Scanning Mikroskop Leica TCS SP ausgerüstet mit:
 - Multiband Confocal Imaging Spectrophotometer
 - ArKr-Laser (Anregungslinien: 476 nm, 488 nm, 568 nm und 647 nm)
 - Ti:Saphir Laser zur 2 Photonen Anregung, Femtosekunden gepulst (Tsunami, Spectra Physics) mit Pumplaser Nd:YVO₄ (Millennia V, Spectra Physics)
 - Inversmikroskop Leica DM IRBE, Objektive: HC PL APO 20 × 0,70 IMM CORR CS
PL APO 40 × 1,25 - 0,75 OIL
HCX PL APO 63.0 × 1.20 W CORR

2.1.3 Fluoreszenzmarkierung und Zucker-Sättigung

2.1.3.1 Fluoreszenzmarkierte Lektine

Alle Lektine wurden von Molecular Probes Europe, Leiden, Niederlande bezogen.

Concanavalin A, AlexaTM 488, (ConA-AlexaTM 488; Abs/Em: 495/519 nm)

Concanavalin A, fluorescein conjugate, (ConA-FITC; Abs/Em: 494/518 nm)

Wheat Germ Agglutinin, tetramethylrhodamine conjugate (WGA-TMR;
Abs/Em: 555/580 nm)

Wheat Germ Agglutinin, Oregon Green[®] 488 conjugate (WGA-Oregon Green[®] 488;
Abs/Em: 496/524 nm)

2.1.3.2 Zucker und Mucin

Folgende Mono- und Disaccharide und Mucin wurden für die Sättigungsexperimente verwendet. Die pH-Werte der 20 mM Lösungen in GM32 sind jeweils in Klammern angegeben.

Methyl- α -D-Glucopyranosid, Sigma Chemical Co., St.Louis, USA (6,0)

Methyl- α -D-Mannopyranosid, Sigma Chemical Co., St.Louis, USA (6,0)

Maltose (4-O- α -D-Glucopyranosyl-D-glucose) Sigma Chemical Co., St.Louis, USA (5,3)

L-Rhamnose, Sigma Chemical Co., St.Louis, USA (5,0)

D(-)-Ribose, Sigma Chemical Co., St.Louis, USA (5,3)

D(+)-Lactose, Riedel-de Haen AG, Sulze-Hannover (4,85)

D-Galactose, Serva, Heidelberg (6,2)

L(-)-Fucose, Sigma Chemical Co., St.Louis, USA (5,8)

D(+)-Cellobiose, Sigma Chemical Co., St.Louis, USA (5,5)

Mucin, Type I-S, from Bovine Submaxillary Glands, Sigma Chemical Co., St.Louis, USA
(5,62, 0,1% ige Lösung)

Mucin from Bovine Submaxillary Gland, Oregon Green[®]488 Conjugate (Abs/Em:
496/524nm) Molecular Probes Europe, Leiden, Niederlande

2.1.4 Auswertung und Dokumentation

Die am CLSM erstellten Bildstapel ("Stacks") wurden mit der Leica Software TCS NT 1.6 und der Leica Confocal Software 2.0 bearbeitet. Das im Internet unter [www: http://rsb.info.nih.gov/ij/](http://rsb.info.nih.gov/ij/) frei erhältliche Programm ImageJ 1.16 wurde mit mehreren Plugin's zur Stackbearbeitung ebenfalls zur Bildbearbeitung genutzt.

Für statistische Auswertungen und die Erstellung von Diagrammen wurde Excel97 und ExcelXP (Microsoft) verwendet.

Die Bestkurven-Berechnung zu den mit der Leica Confocal Software 2.0 berechneten Fluoreszenzspektren wurde mit dem Programm Sigma Plot5 durchgeführt (siehe Kap. 5.2.3).

Das Programm Paint Shop ProTM 7 (Jasc[®] Software, Inc.) wurde zur Nachbearbeitung einzelner Bilder (Kontrast/Helligkeit) und zur Zusammenstellung der Bildtafeln verwendet. Eine Bearbeitung von Bildstapeln ist mit diesem Programm nicht möglich. Die Zeitraffer-Filme aus den am Lichtmikroskop aufgezeichneten Einzelbildern wurden mit Jasc[®] Animation ShopTM 3.00 erstellt.

Die Bilder für Zeitraffer-Aufnahmen am Lichtmikroskop wurden mit der Logitech QuickCam Digitalkamera unter Verwendung der mitgelieferten Bilderfassungssoftware aufgezeichnet.

Zur Dokumentation mikroskopischer und stereomikroskopischer Beobachtungen wurden Dia-Positive mit einer Spiegelreflexkamera (Nikon F-601M) und Digitalaufnahmen mit den Digitalkameras CMOS PRO (1000 Series, Sound Vision, USA) und FinePix S1 Pro (Fujifilm) erstellt.

2.2 KULTURMETHODEN

2.2.1 Kultur von *Geosiphon pyriformis*

Geosiphon wurde auf autoklavierter Erde vom natürlichen Standort in Polypropylen-Blumentöpfen (dunkelbraun, Firma Geli, Höhe 7 cm, Durchmesser 7,5 cm) bei 20°C in einem 14h hell/10h dunkel-Rhythmus im Kulturschrank kultiviert. Für die Beleuchtung mit einer PPFD von $160 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ wurden Leuchtstoffröhren (Phillips TDL 58W/25 CE und Osram L 58W/77 FLUORA) verwendet. Einige Versuche wurden zusätzlich mit *Geosiphon* aus dem Freiland vom natürlichen Standort (Bieber/Spessart) durchgeführt.

Die Kultur von *Geosiphon pyriformis* im Labor war auf Erde vom natürlichen Standort, auf der tatsächlich bereits *Geosiphon* beobachtet wurde, am erfolgreichsten. Kulturversuche auf wenige Meter von beobachteten *Geosiphon* Vorkommen entfernt entnommener Erde schlugen auch nach bis zu 20-fachem Auswaschen der Erde oftmals fehl.

Zur Vorbereitung der Kulturgefäße wurden Filterpapierstreifen durch die vorhandenen Schlitzte im Boden der Blumentöpfe gezogen, um die Kultur später mit genügend Feuchtigkeit versorgen zu können (Abb. 2.1). Die Blumentöpfe wurden mit einer etwa 2 cm dicken Schicht aus grobem Sand (Dehner), gefolgt von einer 1cm starken Schicht aus feinem Quarzsand (Sigma, White Quartz) befüllt. Darauf wurde etwa 4 cm hoch die mit $\frac{1}{2}$ Teelöffel Aktivkohle pro kg Erde gemischte *Geosiphon*-Standorterde gefüllt. Die Blumentöpfe wurden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{Bidest}}$ getränkt und in schmale, hohe 400 ml-Bechergläser (Schott) mit 50 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{Bidest}}$ eingesetzt, so dass die Filterpapierstreifen in das Wasser eintauchten. Bei einigen Kulturen wurde auch ein zu einem Rohr gerolltes Filterpapier durch ein Loch in der Mitte des Kulturgefäßes gezogen. Zur Sterilisation wurden die so vorbereiteten Kulturgefäße 3- bis 5-mal im Abstand von jeweils 1 bis 2 Tagen autoklaviert. Vor dem Animpfen der Kulturen wurde unter sterilen Bedingungen eine unregelmäßige, sehr dünne Aktivkohleschicht auf die Oberfläche gestreut. Als Inokulat wurden entweder etwa 10 bis 20 zusammenhängende Blasen mit etwas Erde und *Nostoc* aus einer älteren Kultur überimpft oder es wurden ca. 20 aus der Erde alter Kulturen isolierte *Geosiphon*-Sporen auf der Erde verteilt und *Nostoc* des Stammes 1:1-26 aus der Kultur zugegeben. Die Kulturgefäße wurden mit Plastikpetrischalen abgedeckt und mit einer doppelten Lage Parafilm verschlossen. Bei vitalem Impfmateri- al entwickelten sich darin nach 2 bis 3 Wochen neue, junge Blasen.

Solche Erdkulturen können über mehrere Monate stabil und kontinuierlich wachsen. Es kam aber immer wieder vor, dass ein Kulturansatz kurz nach dem Überimpfen abstarb oder dass sich zunächst zwar junge Blasen entwickelten, diese aber schnell von *Nostoc* überwuchert

wurden, so dass die Kultur zusammenbrach. Um evtl. geeignetere Kulturbedingungen zu finden, wurden auch verschiedene Erde/Sand/Aktivkohle-Mischungen als Substrat ausprobiert, mit denen allerdings keine Verbesserung der Kultur erreicht werden konnte. Auch Kulturen, die mit verschiedenen Variationen von *Geosiphon*-Medium angezogen wurden (siehe Kap. 2.2.1.1), zeigten keine Unterschiede zu $\text{H}_2\text{O}_{\text{Bidest}}$ -Kulturen. Weder eine hohe (200 μmol) noch eine niedrige (50 μmol) Beleuchtungsintensität hatten Auswirkungen auf die Kultur, ebenso wenig konnten eindeutige Effekte durch unterschiedliche Anzuchttemperaturen (Versuche bei 15°C und 25°C) festgestellt werden.

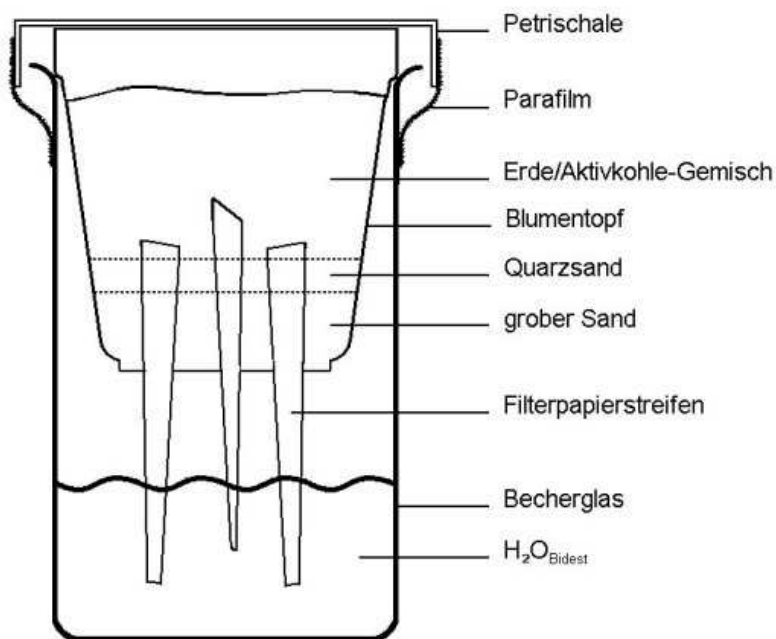


Abb. 2.1 *Geosiphon*-Kulturgefäß.

2.2.1.1 *Geosiphon*-Medium

Ein von A. Schüßler entwickeltes, nährstoffarmes Medium (Tab. 2.1 und Tab. 2.2) wurde zur Durchführung der Experimente für eine zeitlich begrenzte Flüssigkultur verwendet. Schüßler (1995) zeigte, dass eine sehr niedrige Phosphat-Konzentration für die Ausbildung der *Geosiphon*-Symbiose essentiell ist. PIXE-Messungen zeigten einen hohen Gehalt an Brom in Freiland-Blasen (Maetz et al., 1999). Daher wurde 1 μM KBr zum Medium hinzugefügt. *Geosiphon*-Medium wurde auch zur Anzucht von Erdkulturen verwendet, um einen evtl. inhibierenden Effekt auf das Wachstum von *Geosiphon* auszuschließen. Es konnten allerdings keine Unterschiede im Wachstum der Kulturen mit oder ohne KBr festgestellt werden.

Verschiedene Konzentrationen an MES (2(N-Morpholino)-ethansulfonsäure, 0,1 mM oder 0,5 mM), das bei Pflanzen die Aufnahme von Spurenelementen erhöhen kann (Medeiros et al., 1993) sowie unterschiedliche pH-Werte (4,75 oder 6) zeigten ebenfalls keine Auswirkungen auf die Kultur. Die Erde von im Freiland gesammeltem *Geosiphon* ergab einen pH von 6. Das hier verwendete phosphatarme Medium für die *Geosiphon*-Kultur hat einen pH von 5,85, für die *Nostoc*-Kultur wurde der Anteil an K_2HPO_4 auf 0,1 mM erhöht, der pH lag dann bei 6. Zur Herstellung von N-freiem Medium wurde $Ca(NO_3)_2$ durch $CaSO_4$ ersetzt.

Das Medium ermöglicht eine zeitlich begrenzte Flüssigkultur von *Geosiphon*-Blasen, so dass mikroskopische Experimente durchgeführt werden können. Für eine zuverlässige, langfristige Kultivierung von *Geosiphon* ist allerdings noch immer Erde vom natürlichen Standort eine unverzichtbare Voraussetzung.

2.2.2 Präparation von *Geosiphon*-Blasen

Für mikroskopische Beobachtungen wurden einzelne, möglichst saubere *Geosiphon*-Blasen ohne das bereits vorhandene Hyphengeflecht benötigt. Von einer *Geosiphon*-Erdkultur (siehe Kap. 2.2.1) wurden Blasen abgenommen und in einer Petrischale mit $H_2O_{Bideist}$ vorsichtig von Erde und soweit möglich von evtl. vorhandenem *Nostoc*-Bewuchs befreit. Mit feinen Präparationsspinzetten (Dumont Nr. 9) wurden die Blasen dann unter dem Stereomikroskop aus der restlichen Erde und fest haftendem *Nostoc*-Bewuchs herauspräpariert sowie bereits der größte Teil des zusammenhängenden, die Blasen untereinander verbindenden Hyphengeflechts entfernt. Die gesäuberten Blasen wurden in eine Petrischale mit $H_2O_{Bideist}$ überführt. Mit einer als "Mikroskalpell" verwendeten feinen Kanülenspitze (Omnikan® 1ml Feindosierungsspritze, 0,4 mm Durchmesser) wurden alle vorhandenen Hyphen etwa 0,5 Millimeter vor der Basis der Blase abgeschnitten. Diese sehr aufwendige Prozedur, bei der die Blasen leicht angestochen oder zerdrückt werden können, stellt sicher, dass die später beobachteten Inkorporationsstadien tatsächlich unter den Versuchsbedingungen an neu ausgekeimten Hyphen entstanden sind. Die vereinzelter, von Hyphen befreiten Blasen wurden in einer kleinen Petrischale in *Geosiphon*-Medium gesammelt und je nach Experiment in Filterkammern oder auf Mikrotiterplatten überführt.

Tab. 2.1: *Geosiphon* Medium GM32

	Stammlsg (M)	Medium (µl) Ad 1000 ml	Medium (mM)
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,5	200	0,1
Ca(NO ₃) ₂	0,5	400	0,2
KCl	1	100	0,1
MES	1	500	0,5
K ₂ HPO ₄ * 3 H ₂ O	0,01	100	0,001
KBr	0,0001	10	0,001
Lösung I	siehe Tab. 2.2	10	
Lösung II	siehe Tab. 2.2	10	

Tab. 2.2: Spurenelementlösungen für GM-Medien

Spurenelemente	Stammlsg mg/100 ml	Stammlsg mM	Medium ml/1000ml	Medium (µM)
Lösung I				
FeCl ₃ * 6H ₂ O	315,000	11,654	1,00	11,6537
Na ₂ EDTA * H ₂ O	436,000	11,713	1,00	11,7129
Lösung II				
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	2,200	0,077	1,00	0,0765
MnCl ₂ * 4H ₂ O	18,000	0,910	1,00	0,9095
H ₃ BO ₃	100,000	16,173	1,00	16,1734
CoCl ₂ * 6H ₂ O	1,000	0,042	1,00	0,0420
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	1,990	0,082	1,00	0,0822
CuSO ₄ * 5H ₂ O	0,245	0,010	1,00	0,0098
NaHSeO ₃	0,152	0,010	1,00	0,0101
NiCl ₂ * 6H ₂ O	0,244	0,010	1,00	0,0103
Na ₃ VO ₄	0,184	0,010	1,00	0,0100
K ₂ Cr ₂ O ₇	0,147	0,005	1,00	0,0050

2.2.3 Kultur von *Nostoc punctiforme*

Für die Kultur von *Nostoc punctiforme* wurde modifiziertes BG11-Medium (= American Type Culture Collection (ATCC) Medium 616) für Cyanobakterien verwendet (Tab. 2.3). Es stellte sich heraus, dass mit der stickstofffreien Variante BG11-N meist ein besseres Wachstum der Cyanobakterien des Stammes 1:1-26 erzielt wurde. Die Cyanobakterien wurden in Petrischalen auf einer Cellophanauflage auf 2%-igem BG11-Agar (oder BG11-N-Agar) mit einem Tag-/Nachtrhythmus von 14h Licht/ 10h Dunkelheit bei 20°C und einer photosynthetisch aktiven Photonenflussdichte (PPFD) von 45 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ kultiviert.

Es wurde auch *Geosiphon*-Medium mit zusätzlicher Phosphatgabe zur Kultivierung verwendet, um die Cyanobakterien später bei Versuchen zusammen mit *Geosiphon* einzusetzen. Zur langfristigen Kultivierung von *Nostoc* erwies sich das *Geosiphon*-Medium wegen seiner Nährstoffarmut allerdings trotz der erhöhten Phosphatkonzentration als nicht geeignet. Die Cyanobakterien wuchsen auf GM-Medium meist nur langsam und bildeten in Versuchsansätzen kaum Hormogonien aus. *Nostoc* aus BG11 oder BG11-N-Kulturen können ebenfalls in Experimenten zusammen mit *Geosiphon*-Blasen eingesetzt werden, da nur kleine Stücke der *Nostoc*-Thalli benötigt und somit keine großen Nährstoffmengen eingetragen werden.

Tab. 2.3: BG 11-Medium für Cyanobakterien. In Modifikation zum ATCC-Medium 616 wurde der pH-Wert mit HEPES-Puffer / KOH auf 7,1 eingestellt. Stickstofffreies Medium (BG11-N) wurde ohne NaNO_3 hergestellt.

BG11-Medium	Stamm- lösung (g/100ml)	ad 1 l Medium (ml)
NaNO_3	15	10
$\text{K}_2\text{HPO}_4 * 3 \text{H}_2\text{O}$	0,4	10
$\text{MgSO}_4 * 7 \text{H}_2\text{O}$	0,75	10
Citric acid	0,06	10
Fe(III)- NH_4 - EDTA	0,07	10
Na_2CO_3	0,2	10
$\text{CaCl}_2 * 2 \text{H}_2\text{O}$	0,36	10
HEPES	2,38	10
Spurenelement- Lösung		1

Spurenelement- Lösung	(g/1000 ml)
H_3BO_3	2,86
$\text{MnCl}_2 * 4\text{H}_2\text{O}$	1,81
$\text{ZnSO}_4 * 7 \text{H}_2\text{O}$	0,222
$\text{CuSO}_4 * 5 \text{H}_2\text{O}$	0,079
$\text{NaMoO}_4 * 2\text{H}_2\text{O}$	0,39
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 * 6\text{H}_2\text{O}$	0,049

2.3 BELEUCHTUNGSMETHODEN

2.3.1 Transmissionsspektren der verwendeten Lichtfilter

Zur Beleuchtung der Proben mit verschiedenen Lichtqualitäten wurde rote, grüne und blaue Beleuchtungsfolie (Wolfram Dorsch Theaterausstattungen, Mannheim) als Farbfilter verwendet. Mit dem Spektrophotometer DMS 70 UV visible (Varian) wurden Transmissionsspektren der verwendeten Folien im Bereich zwischen 800 nm und 300 nm gemessen (Abb. 2.2, 2.3 und 2.4). Zwischen 700 nm und 800 nm steigt die Transmission bei allen Folien auf maximale Werte von 85% bis 95% bei der Blau- und Rotfolie und 75% bei der Grünfolie an. Die Transmissionsbereiche und -maxima sind in Tab. 2.4 zusammengestellt.

Die Wellenlängenbereiche mit einer Transmission über 25% stimmen mit denen der bei Experimenten zur Hormogonien-Differenzierung von Damerval et al. (1991) verwendeten Farbfilter in etwa überein. Die Autoren geben für eine Transmission über 25% für Rotlicht einen Bereich ab 590 nm, für das Grünfilter die Bereiche von 475 nm bis 570 nm und für Blau 340 nm bis 475 nm an. Sowohl das Blau- als auch das Grünfilter lassen ähnlich wie die hier verwendeten Folien Wellenlängen über 725 nm passieren. Die höhere Transmission für langwelliges Rotlicht der auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten Folien liegt außerhalb des photosynthetisch aktiven Bereichs des Spektrums.

Tab. 2.4: Transmissionsmaxima und -bereiche der verwendeten Farbfilter.

Transmission	Blaufolie	Grünfolie	Rotfolie
Maximum	450 nm	505 nm	680 nm
> 0%	350 - 535 nm + > 680 nm	370 - 600 nm + > 680 nm	> 560 nm
> 10%	392 - 514 nm + > 695 nm	460 - 576 nm + > 710 nm	> 592 nm
> 20%	410 - 496 nm + > 705 nm	475 - 565 nm + > 720 nm	> 600 nm
> 25%	418 - 490 nm + > 710 nm	478 - 560 nm + > 728 nm	> 602 nm

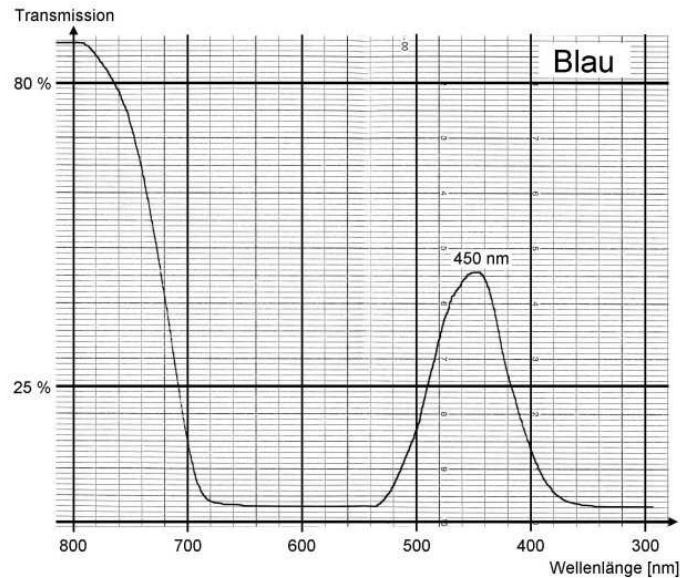


Abb. 2.2: Transmissionsspektrum der Blaufolie im Bereich zwischen 800 nm und 300 nm. Das Transmissionsmaximum im Blaulichtbereich liegt bei 450 nm mit einer Transmission von 46 %. Im Rotlichtbereich von 690 nm bis 800 nm steigen die Transmissionswerte auf 87,6 % an.

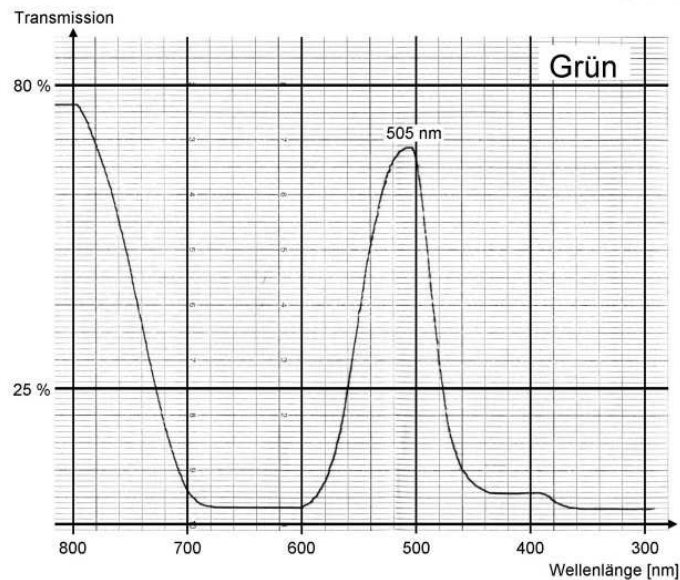


Abb. 2.3: Transmissionsspektrum der Grünfolie zwischen 800 nm und 300 nm. Das Maximum im Grünlicht liegt hier mit 68,6 % bei 505 nm. Auch hier wird die Folie im Rotbereich über 700 nm wieder durchlässig mit einem Maximum von 76,4 % Transmission.

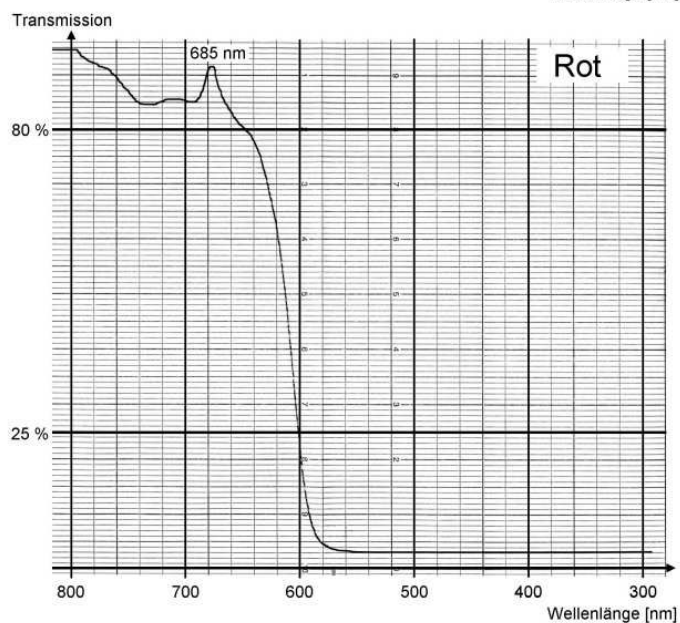


Abb. 2.4: Transmissionsspektrum der Rotfolie zwischen 800 nm und 300 nm. Diese Folie ist durchlässig für Wellenlängen über 600 nm, ab 650 nm liegt die Transmission über 80 %.

2.3.2 Rot-Grün-Synchronisation

Durch eine aufeinanderfolgende Rot- und Grünlichtbeleuchtung kann eine Synchronisation bestimmter Stadien des *Nostoc*-Lebenszyklus erreicht werden (siehe Kap. 3.1.2). Nach Damerval et al. (1991) differenzieren sich innerhalb von 24 Stunden Hormogonien aus vegetativen *Nostoc*-Filamenten. Bei den hier gezeigten Versuchen wurde eine Rotlicht-Bestrahlungszeit von 33 bis 36 Stunden gewählt, da sich die Hormogonien in dieser Zeit außerhalb der Kolonie verteilen und die Filamente so für eine mikroskopische Untersuchung zugänglich sind. Durch die anschließende Dauerbeleuchtung mit grünem Licht wird die weitere Entwicklung der Stadien des *Nostoc*-Lebenszyklus synchron ausgelöst. Im Grünlicht differenzieren sich die Filamente dann zu Primordien und neuen vegetativen Stadien. Diese Methode der Synchronisation wurde zur Charakterisierung des zur Erkennung fähigen *Nostoc*-Stadiums und zur gezielten Induktion von Inkorporationsstadien bei *Geosiphon* angewendet.

Die PPFD wurde für alle Experimente mit einer Photodiode (Photosensor GAASP, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching) gemessen und auf $20 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ eingestellt.

Um die Synchronisation mit Rot- und Grünlicht zu standardisieren, wurde eine programmierbare Beleuchtungsvorrichtung konstruiert, die in einem Kulturschrank aufgestellt wurde (Abb. 2.5). Mit dieser Vorrichtung können zu vorgewählten Zeitpunkten die Farbfilter für die jeweils gewünschte Beleuchtung eingestellt werden, ohne dass es bei der Umstellung der Lichtqualität zu unkontrollierter Einstrahlung von Licht aus der Umgebung kommt.

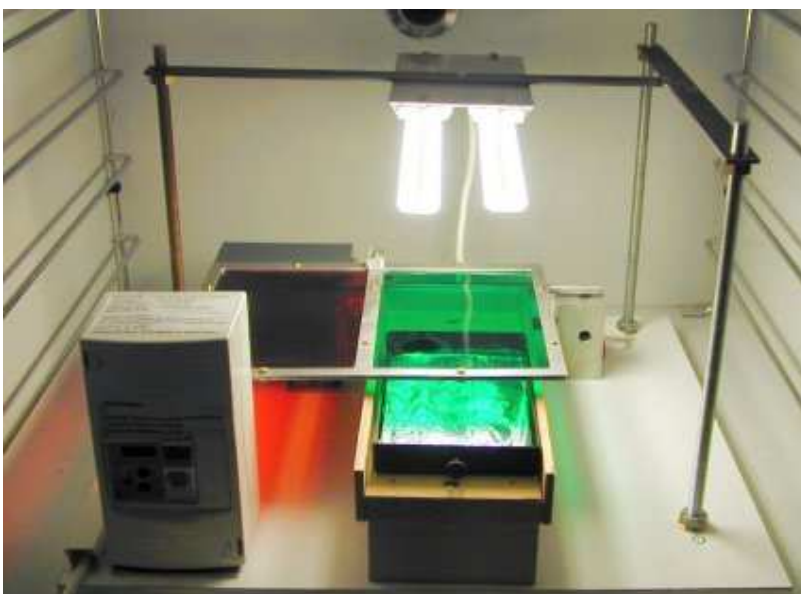


Abb. 2.5: Beleuchtungsvorrichtung für die Rot-Grün-Synchronisation. Über eine Zeitschaltuhr wird ein Elektromotor angesteuert, der die Farbfilter in die gewünschte Position bringt. Die Proben werden in einer Schublade unter das Farbfilter geschoben.

2.4 METHODEN ZUR LEBENDBEOBACHTUNG AM MIKROSKOP

Für die Versuche zur Partnererkennung und Inkorporation war es notwendig, geeignete Methoden zur dauerhaften Beobachtung der lebenden Organismen über längere Zeiträume zu finden. Das System muss dabei sowohl gute Bedingungen für das Wachstum von Cyanobakterien und von *Geosiphon* bieten als auch die Beobachtung von mikroskopischen Details mit guten optischen Eigenschaften zulassen. Dazu wurden verschiedene Kultursysteme mit Flüssigmedium getestet.

Die einfachste Möglichkeit ist die Kultivierung von *Geosiphon* in flüssigem Medium in einer Plastikpetrischale, wo die Blasen eine begrenzte Zeit gut überleben und sich auch neue Blasen bilden. Eine mikroskopische Beobachtung ist hier aber nicht möglich, weil die Organismen nicht fixiert sind und sich frei mit dem flüssigen Medium bewegen. Wenn die Blasen auskeimen und Hyphen bilden, bleiben sie zudem aneinander hängen und bilden ein dichtes Geflecht, was detaillierte und quantitative Auswertungen erschwert. Für Beobachtungen mit dem Stereomikroskop, bei denen es nicht auf Details ankommt, können Experimente in Petrischalen aber einen guten Überblick liefern.

Als weiteres System wurden Kammerobjektträger getestet. Dabei handelt es sich um Plastikobjektträger mit einer Dicke von ca. 5 mm, in deren Mitte sich eine Aussparung befindet, auf die mit Nagellack ein Deckglas geklebt wird. In die dadurch erhaltene Kammer werden die Organismen mit flüssigem Medium gegeben und in einer feuchten Kammer aufbewahrt, um sie vor dem Austrocknen zu schützen. Die Organismen überlebten hier jedoch nur wenige Tage, (möglicherweise ist das Volumen des Mediums zu gering) und waren auch nur schlecht zu beobachten, da sie sich trotz des geringen Flüssigkeitsvolumens in und mit der Flüssigkeit bewegten, was eine mikroskopische Beobachtung stark behinderte.

Für Screening-Versuche, bei denen mikroskopische Details eine weniger große Rolle spielen, erwiesen sich 24 Loch-Mikrotiterplatten als gut geeignete Kulturgefäße. Die Organismen befinden sich hier in einem Volumen von 2 ml Medium, das eine zeitlich begrenzte Kultur über wenige Wochen erlaubt. Die Blasen sinken auf den Boden, wo sie sich mit neu ausgewachsenen Hyphen nach kurzer Zeit anheften und von der Flüssigkeitsbewegung kaum noch betroffen sind. Eine Beobachtung im Stereomikroskop oder bei kleiner Vergrößerung im Mikroskop (z.B. für die quantitative Auswertung der Bildung von Erkennungsstadien und neuer Blasen) ist hier gut möglich. Größere Objektive sowie Nomarski-Optik können allerdings nicht eingesetzt werden, da der Boden der Mikrotiterplatten aus relativ dickem Kunststoff besteht. Die Mikrotiterplatten stellen eine Möglichkeit dar, eine größere Anzahl an parallelen Versuchen zu vergleichen und wurden v.a. zur Durchführung der Sättigungsversuche (Kap. 4.1) eingesetzt.

2.4.1 Filtereinsatzkammern

Für detaillierte mikroskopische Beobachtungen wurden Kunststoff-Petrischalen mit einem Deckglasboden und einem speziellen Zellkultur-Filtereinsatz verwendet (Abb. 2.6). Zur Herstellung der Glasboden-Petrischalen wurde ein Loch von 18 mm Durchmesser in den Boden von 35 mm Plastikpetrischalen der Fa. Roth gestanzt und von unten ein $22 \times 22 \text{ mm}^2$ Deckglas mit Aquariensilicon (Silicone Rubber, Aquaria Sealant, N.V. Dow Corning S.A., Seneff, Belgien) aufgeklebt. *Geosiphon*-Blasen und Teile von *Nostoc*-Kulturen wurden in 0,5 ml Medium in die Vertiefung der Schale auf das Deckglas gegeben und mit flüssigem *Geosiphon*-Medium überschichtet. Um die Bewegung der Organismen mit der Flüssigkeit zu verhindern, wurde ein Zellkultur-Filtereinsatz mit transparenter BioporeTM-Membran (MILLICELL[®]-CM 0,4µm Culture Plate Insert, 30 mm Durchmesser, Millipore), dessen Füßchen entfernt wurden, auf die Vertiefung der Petrischale aufgesetzt. Die Organismen befanden sich dann in dem etwa 1 mm hohen Raum zwischen dem Deckglas und der Filtermembran. Durch die Membran wurde die Bewegung der Flüssigkeit abgefangen und der Raum für das Hyphenwachstum begrenzt. So wurde die Chance erhöht, dass die Hyphen auf dem Deckglas-Boden entlang wachsen und hier auch mit hoch vergrößernden Objektiven erreicht werden können. Die BioporeTM-Membran dieser Filtereinsätze ist für die Mikroskopie optimiert und wird in Flüssigkeit durchsichtig. Sie hat sehr gute optische Eigenschaften und kann auch mit differentiellm Interferenz-Kontrast (DIC) verwendet werden. Fertige Glasboden-Petrischalen für die Inversmikroskopie der Firma WillCo Wells (Amsterdam, Niederlande) konnten nicht verwendet werden, da sie nicht in einer für die Filtereinsätze passenden Größe erhältlich sind. Auch die billigeren Gewebekultureinsätze mit einer 0,2 µm Anopore-Membran der Firma Nunc, Wiesbaden, wurden getestet, ihre pergamentartige Membran ist allerdings zum einen mechanisch nicht sehr stabil, zum anderen ist sie im nassen Zustand zwar durchscheinend, aber nicht durchsichtig, so dass sie für mikroskopische Anwendungen ungeeignet ist.

Für mikroskopische Beobachtungen wurden jeweils etwa 15 bis 30 vereinzelte *Geosiphon*-Blasen mit der zum "Mikrolöffel" gebogen Spitze einer Injektionskanüle (B. Braun, Melsungen; 0,9 mm \times 40 mm) oder mit einer Pasteurpipette auf das Deckglas einer Filterkammer gegeben. Das Flüssigkeitsvolumen, in welchem sich die Blasen auf dem Boden der Filterkammer befinden, sollte zunächst nicht größer als 500 µl sein, da sonst beim Einsetzen des Zellkultur-Filtereinsatzes die Blasen leicht aus der Vertiefung der Petrischale geschwemmt werden. Drei bis vier etwa 2 mm^2 große Stücke eines vegetativen *Nostoc*-Thallus von einer Agar-Cellophan-Kultur wurden zu den Blasen gegeben. Dabei wurde versucht, die Blasen möglichst in die Mitte des Deckglases, die *Nostoc*-Thalli jedoch eher am Rand zu verteilen, um zu verhindern, dass sich Blasen in den Thallusstücken verfangen und von ihnen verdeckt werden. Nach dem Einsetzen des Millipore-Filters wurde *Geosiphon*-

Medium zu einem Endvolumen von 3 oder 4 ml direkt in den Filtereinsatz zugegeben. Der ebenfalls mit einem Deckglas versehene Deckel der Petrischale wurde auf den Rand des Filtereinsatzes, der etwas höher als die Petrischale ist, aufgesetzt und die Petrischale mit Parafilm verschlossen.

Die selbst gefertigten Glasboden-Petrischalen erwiesen sich zusammen mit den Zellkultur-Filtereinsätzen mit BioporeTM-Membran als sehr gut geeignet, um *Geosiphon* und *Nostoc* über einen Zeitraum von 2 bis 3 Wochen zu kultivieren und mikroskopisch zu beobachten. Die Filterkammern besitzen die Vorteile eines Flüssigkultursystems, das einfache Manipulation zum Austausch von Medium oder der Zugabe von Farbstoffen erlaubt, ohne dass die Organismen beschädigt werden und gleichzeitig exzellente optische Eigenschaften zur detaillierten mikroskopischen Analyse lebender Organismen bietet.

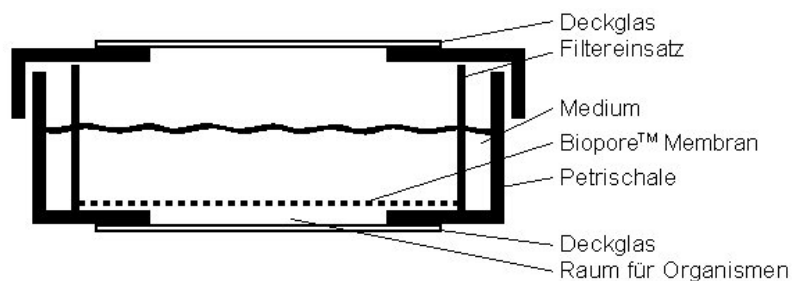


Abb. 2.6: Filterkammer

2.5 CONFOKALE LASER SCANNING MIKROSKOPIE (CLSM)

Die Methode der confokalen Laser Scanning Mikroskopie ist zur genauen 3-dimensionalen Lokalisation von Fluoreszenzsignalen sehr gut geeignet. Eine Einführung in die confokale Mikroskopie findet man bei Cox (1993) sowie bei Conn (1999). Detaillierte Grundlagen zur Theorie und Funktionsweise der Technik sind im Handbook of Biological Confocal Microscopy (Pawley, 1995) beschrieben. Eine Übersicht über verschiedene Techniken und Anwendungen der confokalen Mikroskopie in der Botanik wurde von Hepler und Gunning (1998) zusammengestellt. Daher soll hier nur kurz das grundsätzliche Prinzip der confokalen Mikroskopie sowie die in der vorliegenden Arbeit verwendeten speziellen Anwendungen dargestellt werden.

2.5.1 Das Prinzip der confokalen Laser Scanning Mikroskopie

Das confokale Laser Scanning Mikroskop (CLSM) besitzt als Lichtquelle einen Laserstrahl, der zur Fluoreszenzanregung auf das Objekt fokussiert wird. Das ausgesendete Fluoreszenzlicht wird durch das Objektiv zurück zu einem Detektor (Photomultiplier) geleitet. Dabei wird das Fluoreszenzlicht vom Objektiv auf einen zweiten Punkt, den zum Fokuspunkt im Objekt confokalen Punkt, fokussiert. In dieser zur Fokusebene korrespondierenden Ebene ist eine Lochblende (Pinhole) angebracht, die ausschließlich Fluoreszenzlicht aus der Fokusebene zum Detektor durchlässt. Fluoreszenzlicht aus anderen Ebenen des Objektes, die im Lichtkegel des Anregungslasers liegen, wird zum allergrößten Teil durch die Lochblende ausgeschlossen. Der Strahlengang beim CLSM ist in Abb. 2.7 schematisch dargestellt. Mit einer Scanvorrichtung wird der fokussierte Laserstrahl in einer vorgewählten Ebene Punkt für Punkt durch das Objekt gerastert. Die Intensitätswerte der einzelnen Bildpunkte werden mit dem angeschlossenen Computer als Pixel in einem Graustufenbild dargestellt. Durch den effektiven Ausschluss von Licht anderer Ebenen erhält man so einen "optischen Schnitt", ein scharfes Bild der Fokusebene, auch bei dickeren Objekten. Durch das Scannen mehrerer Ebenen des Objektes erhält man eine Serie optischer

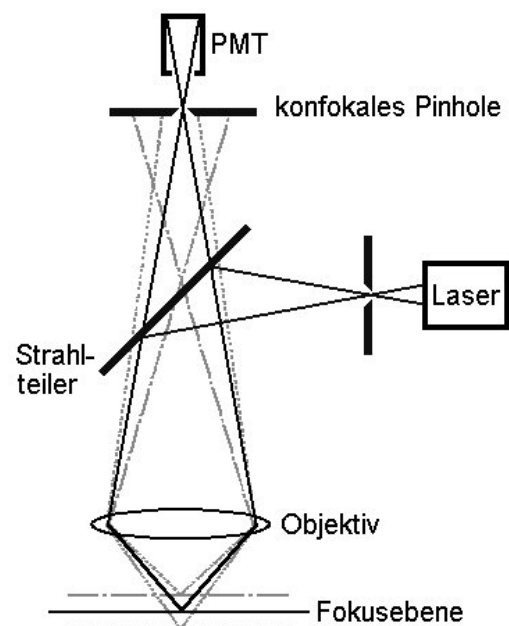


Abb. 2.7: Das Prinzip der confokalen Optik. Nur Fluoreszenzlicht aus der Fokusebene kann das Pinhole passieren und zum Detektor gelangen.

Schnitte (Bildstapel, Stack), aus denen ein dreidimensionales Bild des Objektes rekonstruiert werden kann (in Abb. 4.14 sind einzelne optische Schnitte aus einem Bildstapel gezeigt, in Abb. 4.11 ist die Projektion des ganzen Bildstapels dargestellt). Die Möglichkeit der Erstellung solcher optischen Schnitte ist der wichtigste Vorteil der confokalen Technik. Im Gegensatz zur Epi-Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht die confokale Laser Scanning Mikroskopie damit eine sehr gute Auflösung in z-Richtung, die unter optimalen Bedingungen etwa halb so gut ist wie in xy-Richtung (Leica TCS Manual). Mit der confokalen Optik ist so eine sehr genaue räumliche Zuordnung von Fluoreszenzsignalen möglich.

Zur Co-Lokalisation verschiedener Fluoreszenzmarker wird das Fluoreszenzlicht in verschiedene spektrale Bereiche zerlegt, die simultan mit verschiedenen (bei dem verwendeten Gerät drei) Detektoren verarbeitet werden können. Die digitalisierten Fluoreszenzsignale von jedem Detektor werden als getrennte Kanäle im Computer gespeichert, können aber überlagert (Overlay) und als Falschfarbenbild dargestellt werden. Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten CLSM erfolgt die Aufspaltung des Fluoreszenzlichtes zur Detektion über ein Prisma und erlaubt eine freie Wählbarkeit des Wellenlängenbereiches zur Detektion mit einer minimalen Bandbreite von 5 nm. Dadurch wird als zusätzliche Funktion mit der entsprechenden Steuerungssoftware (Leica Confocal Software) die Messung von Fluoreszenzspektren mit bis zu 50 Messpunkten ermöglicht (siehe Kap. 5.2.2). Das CLSM wurde außerdem zur Zeitraffer-Aufzeichnung (time-lapse) von physiologisch bedingten Änderungen der Fluoreszenzmarkierung genutzt. Dazu wurde noch die Vorgänger-Software Leica TCS-NT eingesetzt.

Das verwendete Gerät bietet auch die Möglichkeit der 2 Photonen Laser Scanning Mikroskopie (2PLSM), bei der durch die gleichzeitige Absorption zweier langwelliger Photonen, die zusammen etwa die Energie eines kurzwelligen Photons besitzen, auch UV-Farbstoffe zur Fluoreszenz angeregt werden können. Diese Methode wird in der Literatur wegen einiger Vorteile als besonders geeignet zur Beobachtung von lebenden Organismen beschrieben (Handbook, Chapter 28). So treten weniger Strahlenschäden auf, da nur im Fokuspunkt Fluoreszenzanregung und Photoschädigungen stattfinden. Bei der 1 Photonen-Anregung wird das Objekt dagegen im gesamten Anregungslichtkegel belastet. Da Infrarotlicht weniger absorbiert wird, kann es tiefer in das Gewebe eindringen, so dass dickere Objekte untersucht werden können. Fluoreszenz entsteht bei der 2PLSM nur im Fokuspunkt, so dass das System auch ohne Pinhole "confokal" ist. Die Methode erwies sich jedoch zur Lebendbeobachtung von Cyanobakterien als ungeeignet, da diese wohl auch das zur Anregung verwendete Licht des nahen Infrarotbereiches (780 nm) absorbieren. Die *Nostoc*-Zellen bleichen dadurch sehr schnell aus und überleben die Bestrahlung nicht.

2.5.2 Anwendung der confokalen Technik

In der vorliegenden Arbeit wurde das CLSM zur Lebendbeobachtung von Entwicklungsvorgängen bei Cyanobakterien und bei *Geosiphon* eingesetzt. Als Fluoreszenzmarker diente die Autofluoreszenz der Cyanobakterien-Pigmente. Zur Färbung der Pilzhypen und des Cyanobakterien-Schleims wurde das mit dem Fluoreszenzfarbstoff ALEXA 488TM oder mit FITC gekoppelte Lektin Concanavalin A in einer Konzentration zwischen 5 und 10 µg pro ml in das Medium zugegeben. Das Lektin bindet spezifisch an Methyl- α -D-Mannopyranoside und zu einem geringen Anteil auch an Methyl- α -D-Glucopyranoside. In einigen Versuchen wurde auch an ALEXA 488TM gekoppeltes Mucin zugegeben, das ebenfalls an die Hyphen und an die Oberfläche der Cyanobakterien bindet. Es trat dabei keine Hintergrundfluoreszenz des Lektin- oder Mucin-haltigen Mediums auf.

Zur Langzeit-Beobachtung der Partnererkennung und Inkorporation (Kap. 4.2) wurden folgende CLSM-Einstellungen verwendet: 63er Objektiv mit Zoom 4, Scan-Geschwindigkeit medium, Bildgröße 512 x 512 Pixel, Laser-Leistung: Power ca. "10 Uhr", AOTF 488 nm 45 % oder AOTF 488 nm und 568 nm mit je 25%, DD488/568, 2 Mittelungen pro Scanebene. Einige Aufnahmen wurden auch mit einer Bildgröße von 1024 x 1024 Pixel oder mehrfachen Mittelungen gescannt, allerdings überlebten die untersuchten Stadien das Scannen dann auch bei mehrstündigen Pausen zwischen einzelnen Aufnahmen nicht. Für einzelne Aufnahmen von Stadien, deren Entwicklung nicht über einen längeren Zeitraum verfolgt werden soll, können jedoch die Auflösung oder die Anzahl der Mittelungen pro Scanebene zur Verbesserung des Signal-/Rauschverhältnisses heraufgesetzt werden.

Bildstapel der Entwicklungsstadien wurden je nach Größe des Objektes mit einem z-Abstand der Bildebenen zwischen 0,8 µm und 1,1 µm aufgenommen. Da es sich hier um recht große Objekte handelt, wurde mit Rücksicht auf die Strahlenbelastung auf eine höhere Auflösung in z-Richtung durch kleinere Abstände der Bildebenen und der damit verbundenen höheren Anzahl von Scans verzichtet.

Aus den 3-dimensionalen Bildstapeln wurden mit der jeweiligen Leica-Software oder mit ImageJ für alle Kanäle Maximumprojektionen zur 2-dimensionalen Darstellung der Bilder erstellt. Zur Berechnung einer Maximumprojektion wird jeweils das hellste Signal eines Bildpunktes aus allen Bildebenen für die Projektion verwendet. Wenn verschiedene Fluoreszenzsignale in mehreren Kanälen aufgezeichnet wurden, kann jedem Kanal eine Farbe zugeordnet werden. Die Projektionen verschiedener Kanäle können wie auch die Einzelbilder zu einem Gesamtbild überlagert werden.

Die Anwendung der Timelapse-Funktion ist in Kap. 3.2.1 und die Methode der Messung von Fluoreszenzspektren in Kap. 5.2.2 beschrieben.

3 Synchronisation und Charakterisierung der Stadien im Lebenszyklus von *Nostoc punctiforme*

3.1 SYNCHRONISATION DES LEBENSZYKLUS

Um die spezifische Erkennung der Symbiosepartner und den Inkorporationsprozess von *Nostoc* durch den Pilz näher charakterisieren zu können, mussten zunächst Methoden entwickelt werden, mit denen sich frühe Aufnahmestadien gezielt induzieren und beobachten lassen. Da bei *Geosiphon* für den Erkennungsprozess nur ein dem Hormogonienstadium folgendes Primordienstadium geeignet zu sein scheint (siehe Kap. 4.2; Mollenhauer et al., 1996), wurde untersucht, ob eine Synchronisation des Lebenszyklus von *Nostoc* und damit eine gezielte Differenzierung von Stadien, welche vom Pilz erkannt werden, erreicht werden kann.

Für mehrere Cyanobakterien-Stämme (*Nostoc muscorum*, *Nostoc commune* 584, *Calothrix* sp. PCC 7601) ist beschrieben, dass verschiedene Lichtqualitäten unterschiedliche Auswirkungen auf den Lebenszyklus der Cyanobakterien haben (Lazaroff & Schiff, 1962; Lazaroff, 1966; Robinson & Miller, 1970; Damerval et al., 1991). Die Beleuchtung mit Rotlicht löst dabei die Bildung von Hormogonien aus, während grünes Licht die Differenzierung von vegetativen Filamenten zu Hormogonien verhindert. Nach Tandeau de Marsac (1994) wird durch die Induktion mit Rotlicht eine synchrone Differenzierung der Hormogonien erreicht, die jedoch während des folgenden Entwicklungszyklus rasch wieder verloren geht. In den oben genannten Studien wurde jeweils nur die Differenzierung zu Hormogonien betrachtet. Nach der chromatischen Induktion wurden die Proben Dunkelheit oder einem Weißlicht/Dunkel-Rhythmus ausgesetzt. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde für den verwendeten *Nostoc*-Stamm 1:1-26 Rotlichtbeleuchtung bereits experimentell zur synchronen Differenzierung von Hormogonien und zum Studium ihrer weiteren Entwicklung im Licht-/Dunkel-Rhythmus genutzt (Schüßler et al., 1997). Wie sich verschiedene Lichtqualitäten auf die folgende Differenzierung der *Nostoc*-Hormogonien in ihrem Lebenszyklus auswirken, ist bisher nicht untersucht. Daher wurden zunächst Versuche zur Reaktion von beweglichen, rotlicht-induzierten Hormogonien auf unterschiedliche Lichtqualitäten durchgeführt. In Zeitreihen-Experimenten wurde dann der Effekt von Rot- und Grünbeleuchtung auf die Hormogonien genauer beobachtet und darauf aufbauend eine Methode entwickelt, mit der sich die im Lebenszyklus von *Nostoc* auf das Hormogonium folgenden Entwicklungsstadien gezielt induzieren und synchronisieren lassen.

3.1.1 Reaktion von Hormogonien auf verschiedene Lichtqualitäten

3.1.1.1 Methode

Für diese Experimente wurde je ein ca. 5 mm² großes Stück einer vegetativen *Nostoc*-Kultur in eine Filterkammer (siehe 2.4.1) mit 3 ml Medium 36 Stunden bei 20°C mit Rotlicht einer PPFD von 20 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bestrahlt. Da die Synchronisation später bei der Untersuchung von *Geosiphon* eingesetzt werden sollte, wurde für diese Versuche das phosphatarme Medium GM32 verwendet. In dem Zeitraum von 36 Stunden entwickelten sich bewegliche Hormogonien, die aus dem vegetativen Thallus herauswanderten und sich auf dem Deckglas der Filterkammer verteilten.

Die beweglichen Hormogonien wurden dann in Parallelansätzen einer Dauerbeleuchtung mit rotem, grünem, blauem oder weißem Licht sowie Dunkelheit oder einem Weißlicht/Dunkel-Rhythmus von 14h/10h beginnend mit der Dunkelphase ausgesetzt. Die Beleuchtung wurde jeweils mit einer PPFD von 20 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durchgeführt. Als Lichtquellen dienten Kaltlichtlampen (150W, Schott KL150, Mainz), die mit den entsprechenden Farbfiltern versehen wurden (siehe Kap. 2.3.1). In den ersten 10 Stunden nach Beginn der Beleuchtung wurden die Proben alle 2 Stunden mikroskopiert und fotografiert, dann nach 24, 28, 34, (40 und 48h nur bei einem Versuch) 56 und 96 Stunden. Zum Mikroskopieren wurde jeweils das gleiche Farbfilter wie zur Dauerbeleuchtung verwendet und die Dunkelprobe mit einem blauen Filter untersucht. Das Experiment wurde unter gleichen Bedingungen viermal wiederholt.

3.1.1.2 Ergebnisse

Im Dauerrotlicht blieb das Hormogonienstadium für mindestens weitere 20 bis 30 Stunden erhalten, bevor die Beweglichkeit der Filamente aufhörte und mit der Bildung der Primordien die weitere Differenzierung im Lebenszyklus eingeleitet wurde (Abb. 3.2). Bei allen anderen Lichtprogrammen stellten die Filamente bereits zwischen 4 und 8 Stunden nach Änderung der Lichtqualität die Bewegung ein (Abb. 3.1). Die weitere Entwicklung verlief dann unterschiedlich. In blauem Licht und in völliger Dunkelheit konnte keine weitere Entwicklung der Zellen beobachtet werden (Abb. 3.4). Es wurde keine mikroskopisch erkennbare Schleimhülle ausgebildet, und es traten selbst nach 4 Tagen keine Primordienstadien auf. Im Grünlicht (Abb. 3.3) wurde dagegen wie in Weißlicht und im Licht/Dunkelrhythmus der Entwicklungszyklus fortgesetzt. Die Zellen wurden größer, nahmen eine runde Form an und bildeten eine Schleimhülle aus. Dabei wurde kein Unterschied zwischen Zellen in Dauerlicht und in einem Licht/Dunkelrhythmus beobachtet.

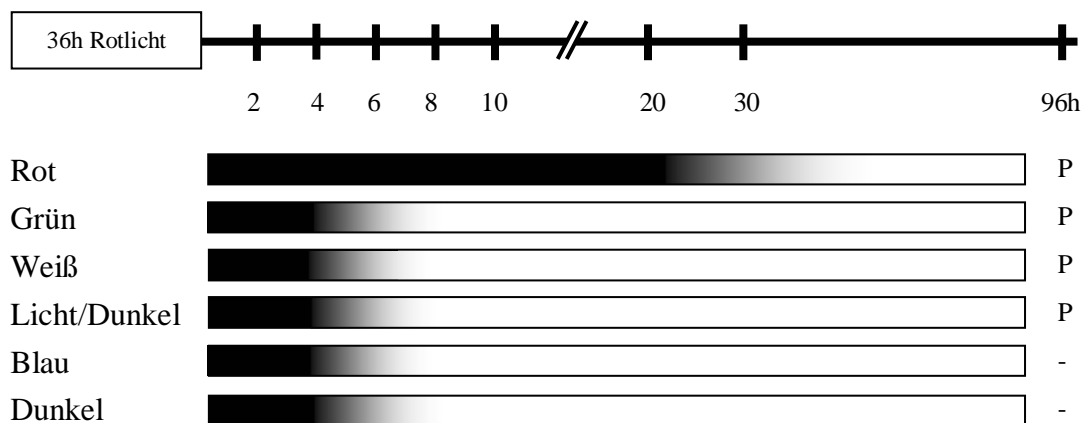


Abb. 3.1: Reaktion Rotlicht-induzierter Hormogonien auf verschiedene Beleuchtungsqualitäten. Die schwarzen Bereiche markieren die Dauer der Bewegungsfähigkeit der Hormogonien nach Beginn der jeweiligen Beleuchtung, in den weiß gezeichneten Zeitbereichen findet keine Bewegung mehr statt. P kennzeichnet eine Entwicklung zu Primordienstadien mit sichtbar ausgebildeter Schleimhülle.

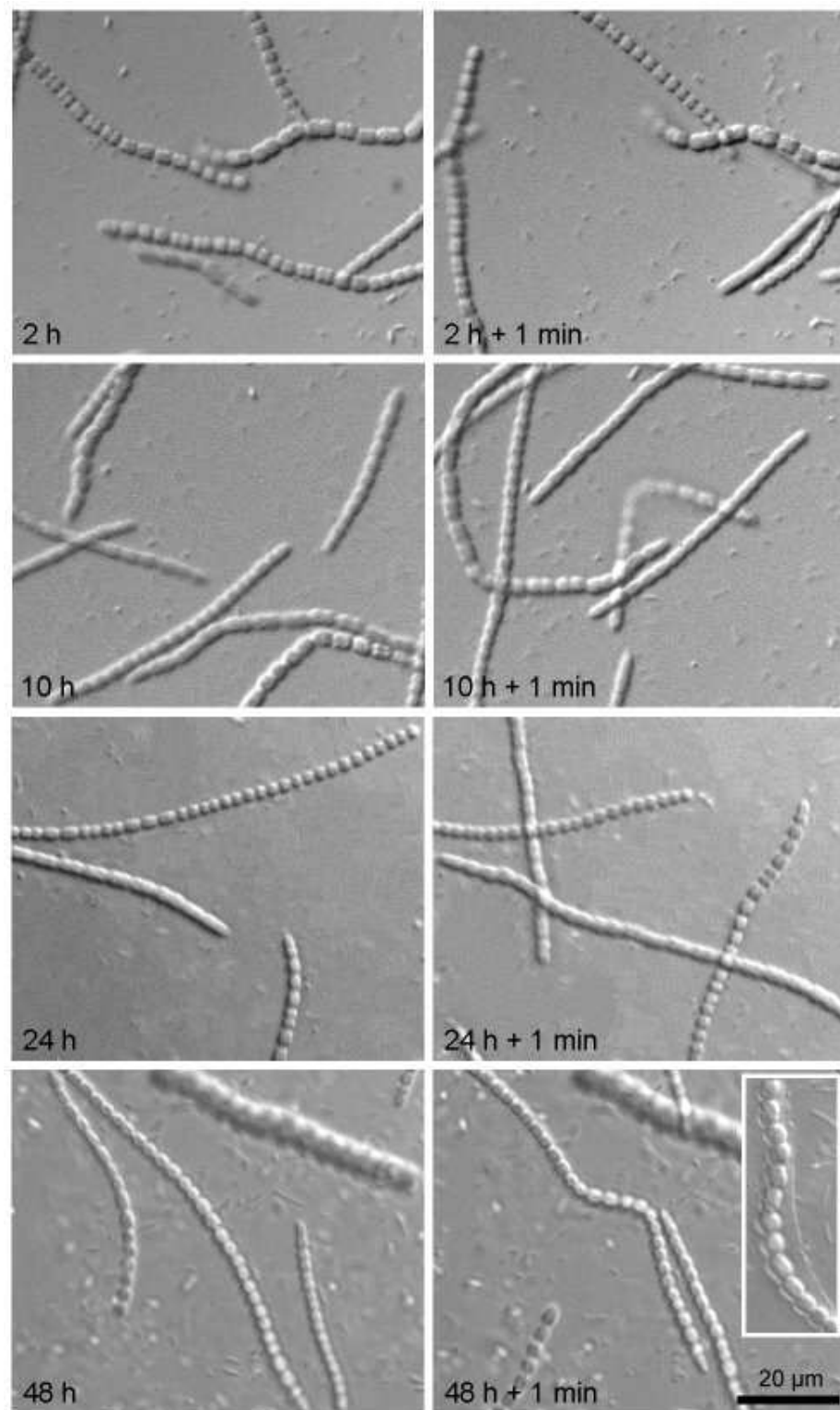


Abb. 3.2: Hormogonien in Rotlicht. Hormogonien, die nach 36 Stunden Rotlichtinduktion weiterer Rotlichtbeleuchtung ausgesetzt sind, bleiben noch mindestens 20-30 Stunden lang beweglich. Nach 48 Stunden zusätzlicher Rotlichtbeleuchtung (insgesamt ca 3,5 Tage) sind hier Primordienstadien mit deutlich ausgeprägter Schleimhülle (Inset) zu erkennen. Zur Dokumentation der Beweglichkeit der Hormogonien wurde jede Probe zweimal im Abstand von einer Minute fotografiert.

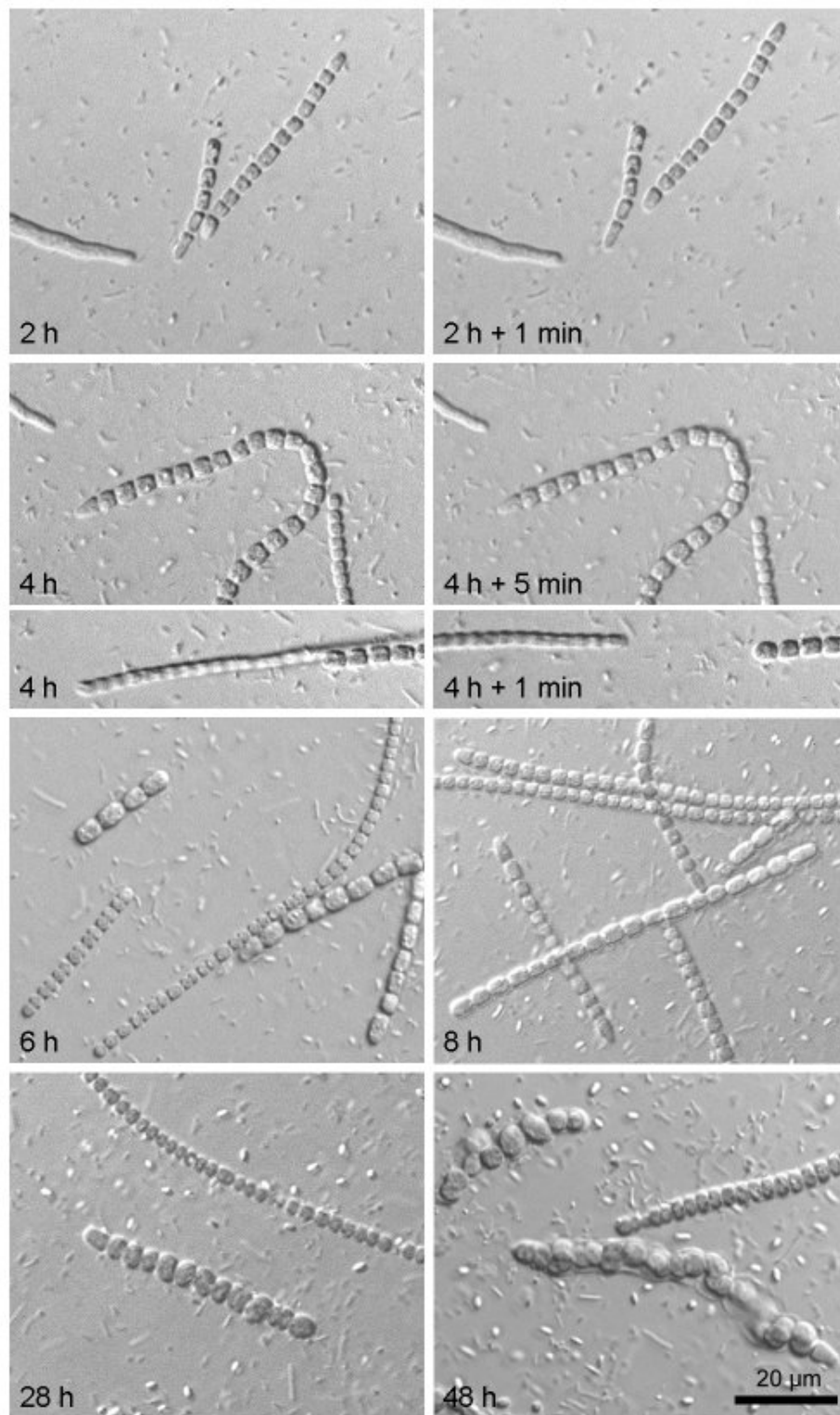


Abb. 3.3: Hormogonien im Grünlicht. Zwischen 4 und 8 Stunden nach Beginn der Grünlichtbeleuchtung hören die Hormogonien auf, sich zu bewegen. Nach 4 Stunden ist die Bewegung meist schon etwas langsamer als in der Rotlichtphase und nach 6 Stunden tritt keine Bewegung mehr auf. Die Zellen beginnen dann zu wachsen und eine neue Schleimhülle zu entwickeln. Nach 48 Stunden sind bereits Primordien mit sichtbarer Schleimhülle vorhanden. Die gleiche Reaktion tritt bei Beleuchtung mit weißem Licht und im Licht/Dunkelrhythmus auf. Wenn die Filamente noch beweglich waren, ist dies durch eine zweite Aufnahme im Abstand von 1 oder 5 Minuten dokumentiert.

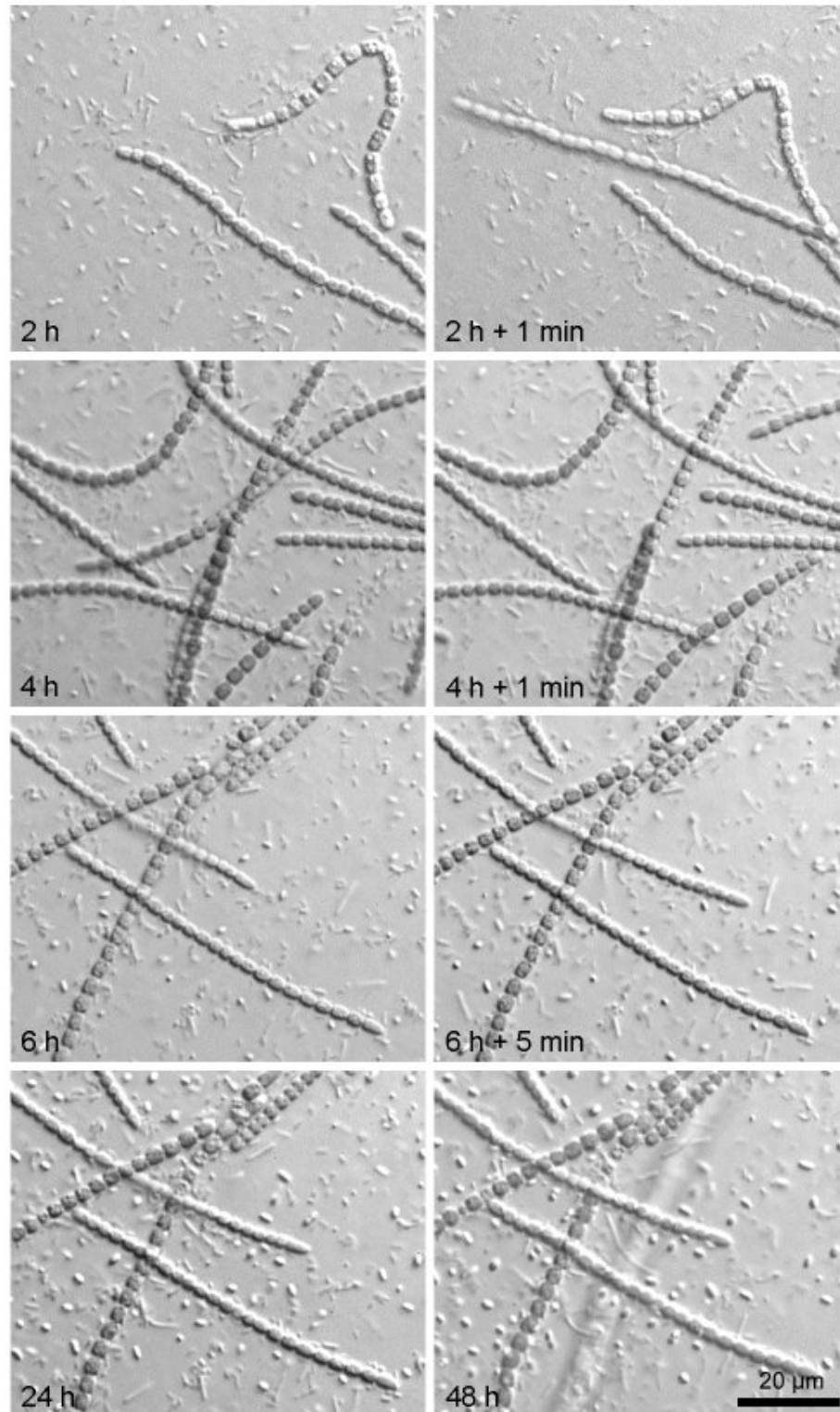


Abb. 3.4: Hormogonien im Blaulicht. Die Bewegung hört ebenfalls zwischen 4 und 8 Stunden auf, danach findet jedoch wie bei den Experimenten in völliger Dunkelheit keine weitere Entwicklung statt, es treten keine Primordien mit sichtbar ausgebildeter Schleimhülle auf. Die Beweglichkeit der Hormogonien ist gegebenenfalls durch eine zweite Aufnahme im Abstand von 1 oder 5 Minuten dokumentiert.

3.1.2 Rot-Grün-Synchronisation des Primordienstadiums

Durch die Beleuchtung von Rotlicht-induzierten Hormogonien mit weißem oder grünem Licht lässt sich, wie oben gezeigt, gezielt die Differenzierung der folgenden Stadien im Lebenszyklus der Cyanobakterien auslösen (Abb. 3.1). Diese Induktion wurde mit Zeitraffer-Digitalaufnahmen genauer beobachtet. Außerdem wurde eine Methode entwickelt, mit der sich die Differenzierung der *Nostoc*-Filamente synchronisieren lässt. Um die erneute Bildung von Hormogonien nach Abschluss der Induktion durch Rotlicht, hier als "sekundäre" Hormogonien bezeichnet, zu verhindern, wurde für diese Experimente die Grünlicht-Beleuchtung gewählt.

3.1.2.1 Methode

Ein Teil einer vegetativen *Nostoc*-Kolonie wurde, wie oben beschrieben, zur mikroskopischen Beobachtung in eine Filterkammer überführt und zur Bildung von Hormogonien direkt im Mikroskop mit Rotlicht bestrahlt. Die Cyanobakterien wurden dann entweder weiter im Rotlicht belassen oder nach 33 Stunden Rotlicht durch Wechsel des Filters im Strahlengang des Mikroskops mit Grünlicht bestrahlt. Dabei wurde sowohl die Reaktion beweglicher Hormogonien auf kontinuierliche Rotlichtbeleuchtung als auch im Vergleich dazu die Reaktion beweglicher, Rotlicht-induzierter Hormogonien auf die Beleuchtung mit Grünlicht über mehrere Tage verfolgt und dokumentiert. Damit dieselbe Stelle der Probe ohne Positionsveränderung über einen längeren Zeitraum beobachtet werden konnte, wurde die Filterkammer direkt im Inversmikroskop mit $20 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ der jeweiligen Lichtqualität bestrahlt. Der Kondensor sowie die Kondensor- und die Leuchtfeldblende des Mikroskops wurden so eingestellt, dass die ganze Fläche der Filterkammer gleichmäßig ausgeleuchtet war. Damit ist zwar keine Köhlersche Beleuchtung mehr gegeben, aber die Bildqualität ist ausreichend, um die Beweglichkeit der Hormogonien zu überprüfen. Für die Beobachtungen wurde ein 10x Objektiv verwendet, um eine ausreichende Anzahl an Filamenten für eine quantitative Auswertung in dem ausgewählten Bildausschnitt untersuchen zu können. Es wurde eine Stelle direkt neben der vegetativen Kolonie ausgewählt, um zu beobachten, wann die ersten beweglichen Filamente aus dieser auszuwandern beginnen (Abb. 3.5). Mit der Zeitraffer-Funktion der an das Mikroskop angeschlossenen Digitalkamera (Connectix QuickCam, Logitech) wurden über einen Zeitraum von bis zu 4 Tagen alle 30 Minuten ein Graustufenbild (640 x 480 Pixel) aufgenommen. Dadurch ist eine kontinuierliche Beobachtung über mehrere Tage mit einer genaueren zeitlichen Auflösung als bei den oben gezeigten Experimenten möglich. Durch Auszählen der Filamente, die von einem zum

nächsten Bild der Zeitreihe ihre Lage verändert hatten, wurde die Anzahl der beweglichen und unbeweglichen Filamente zu jedem Zeitpunkt bestimmt.

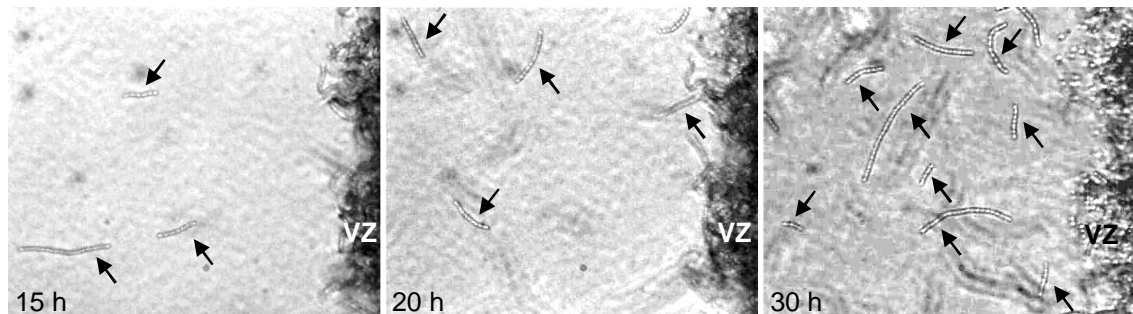


Abb. 3.5: Auswandern von Hormogonien (Pfeile) aus dem Lager der vegetativen Zellen (VZ) nach 15, 20 und 30 Stunden Bestrahlung der vegetativen *Nostoc* (am rechten Bildrand) mit Dauerrotlicht. Die Hormogonien befinden sich beim Auswandern oft nicht in der Fokusebene und werden auch durch ihre Bewegung unscharf abgebildet.

3.1.2.2 Ergebnisse

Die Zeitreihen-Untersuchungen zeigten, dass nach ca. 15-20 Stunden Rotlichtbeleuchtung die ersten fertig entwickelten Hormogonien aus der Kolonie heraus zu wandern begannen (Abb. 3.5). Nach etwa 30 Stunden hatten sich viele Hormogonien außerhalb des Inokulums auf dem Deckglas verteilt und konnten gut mikroskopisch beobachtet werden. Abb. 3.6 zeigt, dass unter Dauerrotlicht für ca. 45 Stunden praktisch alle gebildeten Hormogonien beweglich blieben. Nach 72 Stunden waren noch immer über 60% der Filamente beweglich. Im Gegensatz dazu hörte im Grünlicht die Bewegung bereits in den ersten 6 bis 7 Stunden nach Beleuchtungswechsel auf (Abb. 3.6).

In den folgenden Versuchen wurden die Rotlicht-induzierten Hormogonien schon nach 33 Stunden mit Grünlicht bestrahlt, da zu diesem Zeitpunkt einerseits genügend Hormogonien für eine quantitative Analyse aus dem Lager der vegetativen Zellen ausgewandert sind, andererseits aber sichergestellt ist, dass sich alle ausgewanderten Filamente noch in der motilen Phase befinden. Werden solche Rotlicht-induzierten beweglichen Hormogonien mit Grünlicht bestrahlt, hört die Bewegung der Filamente zwischen 3 und 7 Stunden komplett auf. Zwischen 2 und 5 Stunden treten zwar zwischen den einzelnen Experimenten Unterschiede im Anteil der unbeweglichen Filamente auf, der grundsätzliche Effekt der Grünlicht-Beleuchtung, nämlich das Aufheben der Beweglichkeit, war jedoch bei allen Versuchen eindeutig feststellbar und kann als gesichert gelten (Abb. 3.6). Der Verlust der Bewegungsfähigkeit der *Nostoc*-Hormogonien ist gekennzeichnet durch eine Verlangsamung der Bewegung, bis nur noch typische kurze Vor- und Rückbewegungen auftreten. Mit der

Digitalkamera wurde durch Aufzeichnen von Bildern alle 60 Sekunden ein Zeitraffer-Film aufgenommen, der den Verlust der Bewegungsfähigkeit im Grünlicht zeigt. In Abb. 3.7 sind Bilder im Zeitabstand von 20 Minuten aus dem Film zusammengestellt.

Die *Nostoc*-Filamente entwickeln sich im Dauergrünlicht weiter zu Primordien und vegetativen Stadien (Abb. 3.1). Die Grünlicht-Beleuchtung verhindert dabei die Entwicklung "sekundärer" Hormogonien, was eine wichtige Voraussetzung für eine Synchronisation der Stadien ist.

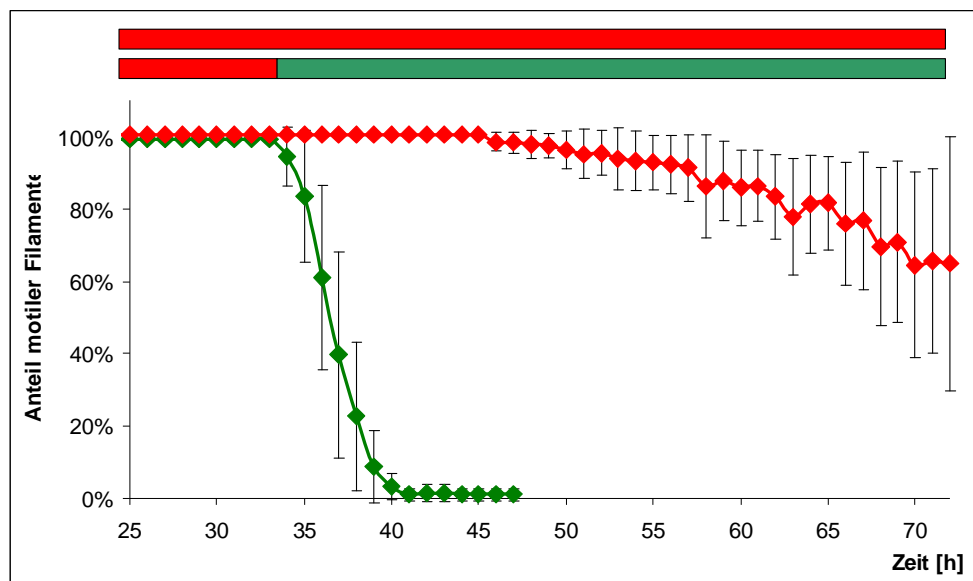


Abb. 3.6: Die Erhaltungsdauer des durch 33 Stunden Rotlicht induzierten Hormogonienstadiums im Dauerrotlicht bzw. nach dem Wechsel der Beleuchtungsqualität zum Grünlicht. Rote Kurve: Mittelwert aus 4 Zeitreihen im Dauerrotlicht, grüne Kurve: Mittelwert aus 6 Zeitreihen rotlichtinduzierter Hormogonien im Grünlicht.

Abb. 3.7 (nächste Seite): Verlust der Bewegungsfähigkeit rotlichtinduzierter Hormogonien im Grünlicht. Bilder im Zeitabstand von 20 Minuten aus einem Zeitraffer-Film (1 Bild/Minute, 10x Objektiv, Connectix Quick Cam). Der Pfeil markiert eine Stelle, an der 2 Filamente nach typischen langsamen Vor- und Rückbewegungen liegen bleiben.

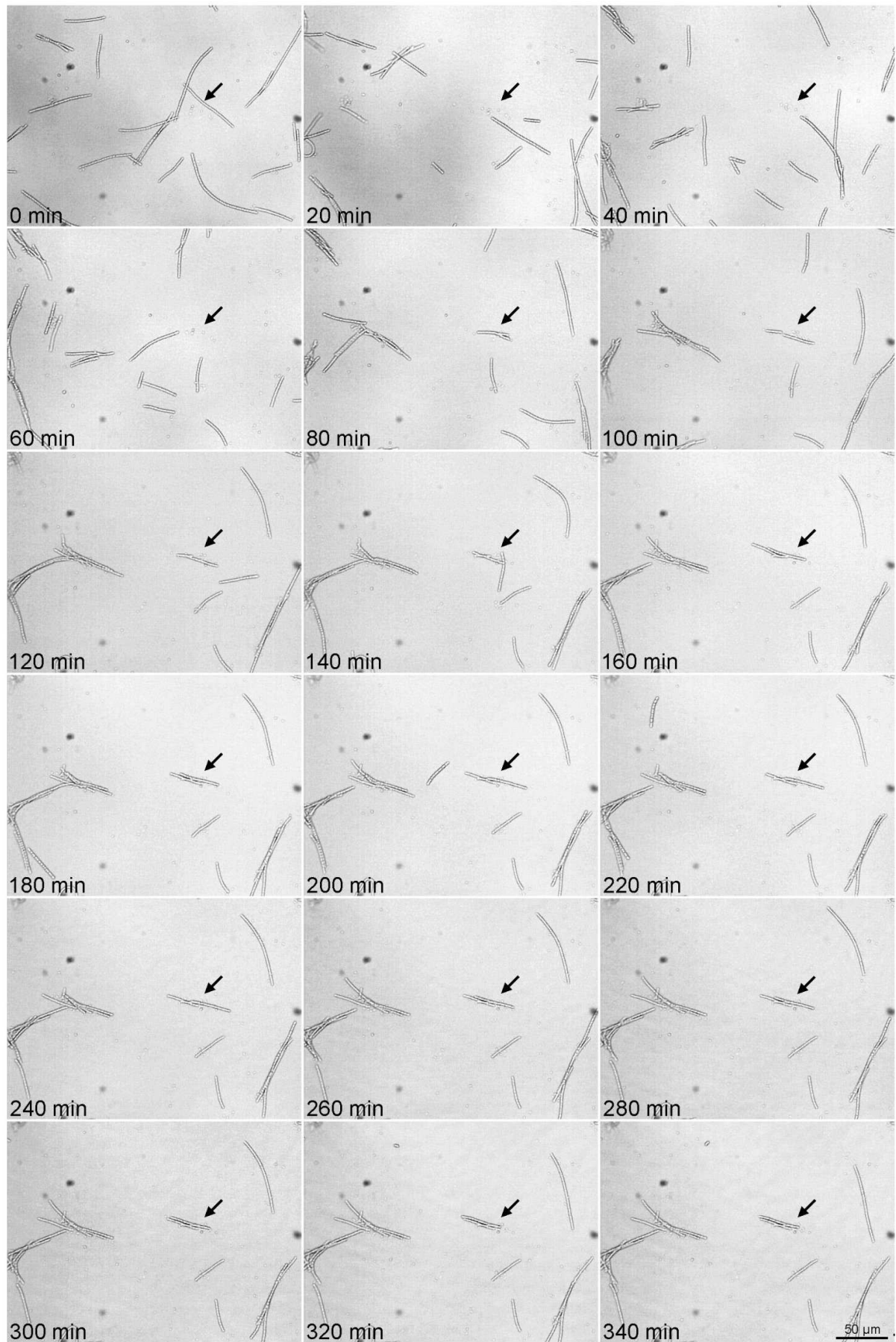


Abb. 3.7

3.1.3 Diskussion

Die Versuche zeigen, dass Rotlicht-induzierte Hormogonien auf Licht verschiedener Wellenlängen unterschiedlich reagieren. Im Dauerrotlicht kann das Hormogonienstadium bis über 72 Stunden andauern, bevor der Entwicklungszyklus fortgesetzt wird. Die gebildeten vegetativen Stadien können sich im Rotlicht direkt wieder zu neuen "sekundären" Hormogonien entwickeln. In weißem, grünem und blauem Licht sowie in Dunkelheit und im Licht/Dunkel-Rhythmus wird durch die Änderung der Lichtqualität das Ende der Hormogonienphase initiiert. Die Filamente werden innerhalb von 3 bis 7 Stunden unbeweglich. Eine Weiterentwicklung zu Primordien mit sichtbarer Schleimhülle findet aber nur bei Weiß- (Dauerlicht oder Licht/Dunkel) und Grünbeleuchtung statt. In blauem Licht und in Dunkelheit kann keine weitere Entwicklung festgestellt werden.

Die Beleuchtung der Proben wurde bei allen Lichtqualitäten mit einer PPDF von $20 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durchgeführt. Licht verschiedener Wellenlängen hat einen unterschiedlich hohen Energiegehalt, so dass die Proben bei der verwendeten Beleuchtungsart mit unterschiedlich viel Energie versorgt werden. Ein grober Vergleich der bei den verschiedenen Lichtqualitäten eingestrahlten Energie ergibt nach $E = h \cdot c / \lambda$ (E =Energie eines Photons, h =Plancksches Wirkungsquantum, c =Lichtgeschwindigkeit, λ =Wellenlänge) für die verwendete Beleuchtung von $20 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Energiegehalte von 3,51 J für Rotlicht (680 nm), 4,73 J für Grünlicht (505 nm) und 5,31 J für blaues Licht (450 nm). Dass in völliger Dunkelheit keine weitere Entwicklung stattfindet, verwundert nicht, da hier keine Energie zur Verfügung steht. Im Blaulicht findet allerdings auch keine Entwicklung statt, obwohl hier die höchste Energiemenge eingestrahlt wird. In grünem und weißem Licht unterscheidet sich die weitere Entwicklung nicht. Ein weiterer Hinweis, dass weniger der Energiegehalt als die Signalwirkung bestimmter Wellenlängen eine Rolle bei der Differenzierung im Lebenszyklus spielt, sind Ergebnisse von Herdman und Rippka (1988) sowie von Damerval et al. (1991), nach denen bereits eine Dauerbestrahlung mit Rotlicht von nur $1 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ die Differenzierung von Hormogonien bei *Calothrix* auslöst. Blaues Licht zeigte bei Experimenten von Damerval et al. (1991) im Gegensatz zur hemmenden Wirkung von Grünlicht (beides bei einer PPDF von $10 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) keinerlei Signalwirkung.

Die Beleuchtung von Hormogonien mit grünem Licht bewirkt den Verlust der Bewegungsfähigkeit in einer kurzen Zeitspanne von 3-4 Stunden und scheint somit ein klares Signal für die Fortsetzung der Entwicklung im Lebenszyklus zu neuen vegetativen Zellen zu geben (Abb. 3.8). Über den Mechanismus der Photoregulation durch rotes und grünes Licht, die ja auch bei der chromatischen Adaptation eine große Rolle spielt, ist nur wenig bekannt. Dass die Zellzyklus-Regulation durch die gleichen Wellenlängen gesteuert werden kann wie die chromatische Adaptation, bedeutet nicht notwendigerweise, dass es sich um die gleichen Mechanismen handelt. Bei der Differenzierung zu Hormogonien im Rotlicht wird bei

Calothrix die Transkription aller Phycobiliproteingene gestoppt, während bei der chromatischen Adaptation gezielt entweder Phycocyanin-2 oder Phycoerythrin exprimiert wird (Damerval et al., 1991). Die Regulation spielt sich daher wahrscheinlich auf transkriptioneller Ebene ab. Die Art der beteiligten Photorezeptoren und Signalmoleküle ist jedoch noch unbekannt.

Weitere Experimente, bei denen vor Beginn der Rotlichtinduktion eine Grünlichtphase von 24 oder 48 Stunden vorgeschaltet wurde, hatten zum Ziel, die Synchronisation durch ein weiteres Signal zu verstärken. Die Differenzierung von Hormogonien wird aber nicht nur durch Rotlichtbeleuchtung sondern auch durch andere Faktoren wie die Versorgung der Cyanobakterienkultur mit frischem Nährmedium ausgelöst. Nach Herdman und Rippka (1988) beruht dieser Effekt auf der Verdünnung bzw. Auswaschung eines hemmenden Faktors, der in der exponentiellen und stationären Phase des Wachstums gebildet wird und die Differenzierung von Hormogonien verhindert. Dieser Faktor ist bisher nur als ein kleines Molekül charakterisiert, das durch Autoklavieren seine Wirkung verliert, darüber hinaus aber noch nicht näher identifiziert werden konnte. In den Experimenten mit vorgeschalteter Grünlichtphase entwickelte sich ein Teil der vegetativen *Nostoc* durch den Transfer in das frische GM32-Medium in den Filterkammern trotz der Grünlichtbeleuchtung zu Hormogonien. In der folgenden Rotlichtphase wurden dann zwar meist noch einmal Hormogonien gebildet. Dies führte dann aber zu einem Gemisch verschiedener Entwicklungsstadien, was die Identifizierung des für die Erkennung durch den Pilz kompetenten *Nostoc*-Stadiums erschwerte. Deshalb wurde der verstärkende Effekt des frischen Mediums genutzt, indem bei einigen Experimenten die *Nostoc*-Thalli vor Zugabe in die Filterkammer eine Stunde mit H₂O bidest gewaschen wurden, um durch Auswaschung eines evtl. vorhandenen hemmenden Faktors die Differenzierung von Hormogonien zu fördern. Es traten dennoch bei allen verwendeten Vorbehandlungen Unterschiede in der Ausbeute, der Ausbreitungsgeschwindigkeit und der Dauer der beweglichen Phase der Hormogonien im Dauerrotlicht auf. Dies lässt den Schluss zu, dass weitere Faktoren wie das Alter und der physiologische Zustand (verfügbare Feuchtigkeit und Nährstoffe) der jeweils verwendeten *Nostoc*-Thalli ebenfalls Einfluss auf die Bildung von Hormogonien haben müssen.

Es wurde bereits beschrieben, dass bestimmte mineralische Nährstoffe (Phosphat, Eisen, Nitrat) Auswirkungen auf die Differenzierung von Hormogonien haben können (Tandeau de Marsac, 1994). So führte bei verschiedenen Cyanobakterien-Stämmen, die unter Phosphat-limitierten Bedingungen kultiviert worden waren, die Zugabe von Phosphat zur Bildung von Hormogonien. In Experimenten mit einem etwas phosphatreicheren Medium (GM32 mit 100 µM Phosphat) wurde auch für den hier verwendeten *Nostoc*-Stamm 1:1-26 eine erhöhte Ausbeute an Hormogonien beobachtet. Bei anderen symbiotischen Assoziationen von *Nostoc* mit *Anthoceros punctatus* (Cohen & Meeks, 1997), *Gunnera manicata* (Rasmussen et al.,

1994) und den Wurzeln von Weizen (*Tritium vulgare*, Gantar et al., 1993) wurde eine fördernde Wirkung von Pflanzenexsudaten auf die Bildung von Hormogonien beobachtet, welche für die Etablierung der Symbiosen als Infektionsstadium essentiell sind. Obwohl Moosexsudate die Bildung von Hormogonien auch bei dem aus der *Geosiphon*-Symbiose isolierten Cyanobakterien Stamm 1:1-26 fördern (Schüßler, persönliche Mitteilung), wurde eine solche Förderung durch *Geosiphon* bisher nicht beobachtet.

Grünlicht verhindert und stoppt nicht nur die Bildung von Hormogonien, wie bereits von Lazaroff (1966), Robinson & Miller (1970) und Damerval et al. (1991) beschrieben, sondern bewirkt auch gezielt die Differenzierung des vegetativen Stadiums im Lebenszyklus (siehe Abb. 3.8). Die aufeinanderfolgende Beleuchtung der Cyanobakterien mit Rotlicht zur Bildung von Hormogonien und anschließend mit Grünlicht zur Differenzierung der folgenden Stadien des Lebenszyklus kann damit zur Synchronisation der Lebensstadien über einen begrenzten Zeitraum genutzt werden. Diese Methode wurde in den folgenden Versuchen zur Charakterisierung des für die Erkennung durch den Pilz kompetenten *Nostoc*-Stadiums und zum Studium des Inkorporationsprozesses verwendet.

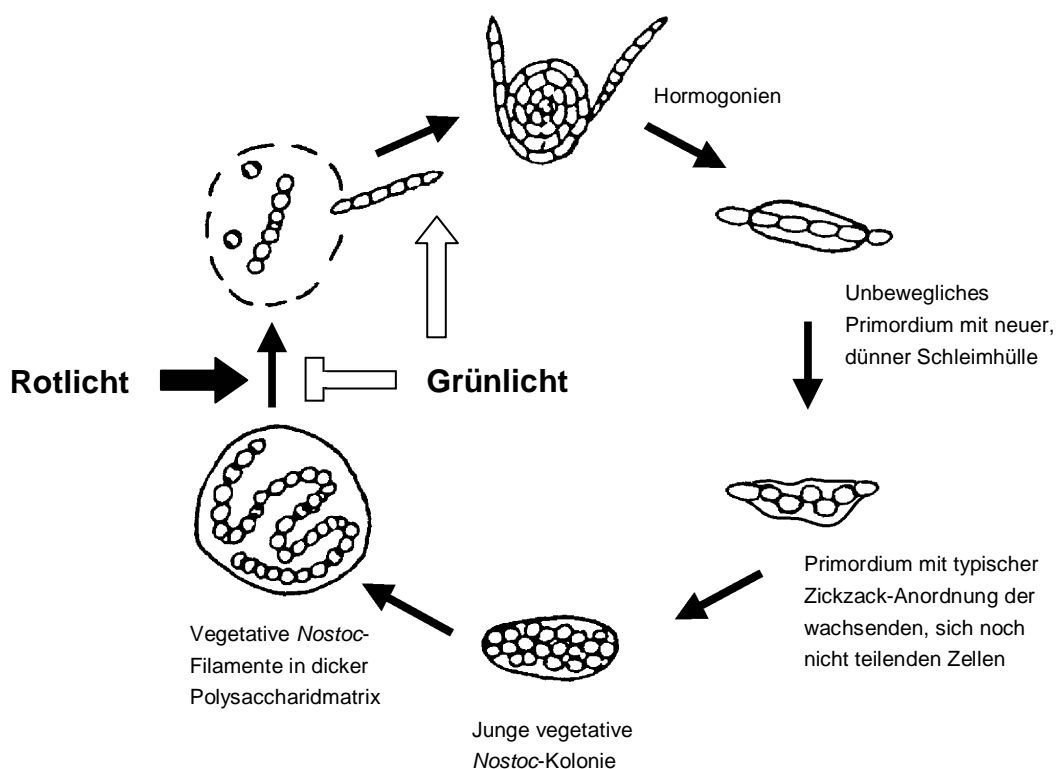


Abb. 3.8: Wirkung von Rot- und Grünlicht auf den Lebenszyklus von *Nostoc*. Rotlicht bewirkt die Differenzierung vegetativer Filamente zu beweglichen Hormogonien, während die Beleuchtung mit Grünlicht diese Differenzierung verhindert und beweglichen Hormogonien das Signal zur weiteren Entwicklung gibt. Dabei wird in Grünlicht der komplette Zyklus bis zu neuen vegetativen Kolonien durchlaufen. Lebenszyklus verändert nach Robinson & Miller, 1970.

3.2 LEKTIN-MARKIERUNG LEBENDER CYANOBAKTERIEN

Schüßler et al. (1997) beobachteten das Auftreten eines oder mehrerer Mannose-haltiger Glykokonjugate an der Oberfläche der Cyanobakterien beim Übergang vom Hormogonien- zum Primordien-Stadium. Mit der Methode der Synchronisation des *Nostoc* Lebenszyklus mit Rot- und Grünlicht konnte diese Veränderung mit genauerer zeitlicher Auflösung untersucht werden. Dazu wurden CLSM-Beobachtungen an lebenden *Nostoc*-Filamenten durchgeführt, die mit dem fluoreszenzmarkierten Lektin ConA gefärbt wurden.

3.2.1 Methode

Die Ansätze wurden wie in Kap. 3.1.2 beschrieben vorbereitet und 33 Stunden mit $20 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Rotlicht im Kulturschrank bestrahlt. Vor Beginn der Grünlichtphase wurden $10 \mu\text{g/ml}$ des mit dem Fluoreszenzfarbstoff AlexaTM 488 markierten Lektins Concanavalin A (ConA, Molecular Probes) zugegeben. Ab Beginn der Grünlichtbeleuchtung direkt im Mikroskop wurde mit der Timelapse-Funktion der TCS NT Software (Leica) eine ausgewählte Stelle der Filterkammer alle 30 Minuten gescannt. Bei dem Versuch, jeweils nur eine Ebene aufzuzeichnen, trat allerdings häufig eine Verschiebung der eingestellten Fokusebene in z-Richtung auf. Die Cyanobakterien-Filamente befanden sich dann nicht mehr in der Scanebene. Um diese Fokusdrift auszugleichen, wurde jeweils ein Bildstapel mit 16 Ebenen im Abstand von $1 \mu\text{m}$ bei zweifacher Mittelung erstellt. Bei wenigen Versuchen ist dennoch die Aufzeichnung von jeweils nur einer Ebene (4-fach gemittelt) gelungen, so dass Bilder im Abstand von nur 2 Minuten aufgenommen und ein Zeitraffer-Film erstellt werden konnte.

Die CLSM-Bilder wurden mit folgenden Einstellungen gescannt: Leistung des ArKr - Lasers auf ca. "9 Uhr"; Fluoreszenzanregung: AOTF 488 nm und 568 nm jeweils auf 25 %; Detektion: Kanal 1: 500 nm bis 560 nm (AlexaTM488 -Fluoreszenz), Kanal 2: 580 nm bis 735 nm oder 600 nm bis 690 nm (Phycobiliprotein- und Chlorophyll-Fluoreszenz); Scan-Geschwindigkeit: medium; Bildgröße 512×512 Pixel; Objektiv: $40 \times \text{Öl}$; Zoom 1; Pinhole 1 Airy. Da die Hormogonien zu Beginn der Aufnahmen noch keine ConA-Färbung aufweisen, konnte der Messbereich des PMT für den Grün-Kanal jeweils nur anhand eines älteren Ansatzes mit gefärbten Primordien abgeschätzt werden. Dadurch wurde das Signal v.a. zu Beginn der Bildung des Mannose-haltigen Glykokonjugats nur schwach detektiert und ist in der Überlagerung der beiden Kanäle nur schwer zu erkennen. Für den Timelapse wurde eine kontinuierliche Zeitschleife eingestellt. Die Lichtquelle des Mikroskops und der Kondensor wurden so eingestellt, dass die Filterkammer mit den Cyanobakterien gleichmäßig mit $20 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ausgeleuchtet war. Trotz der Dauergrün-Beleuchtung im Mikroskop konnte ein klares Signal des grün fluoreszierenden AlexaTM488 - Farbstoffs detektiert werden.

3.2.2 Ergebnisse

Die ersten mit ConA-AlexaTM 488 markierten Filamente treten nach 2 bis 3 Stunden Grünlichtbeleuchtung auf (Abb. 3.9 und Abb. 3.10). Das Fluoreszenzsignal hat zu Beginn nur eine geringe Intensität, die aber mit der weiteren Entwicklung und Bildung des Glykokonjugates zunimmt. Dieser langsame Anstieg der Fluoreszenzintensität ist nicht auf eine Akkumulation des Farbstoffs zurückzuführen, da andere im unsteril durchgeführten Ansatz vorhandene Mikroorganismen und ältere *Nostoc*-Filamente der Kolonie schon kurz nach Zugabe des fluoreszenzmarkierten Lektins eine starke Markierung aufwiesen. Nach 5 bis 7 Stunden zeigten alle Filamente eine Fluoreszenzmarkierung. Die Markierung trat häufig zunächst an einzelnen Zellen oder Teilen eines Filaments auf, griff dann aber auf das ganze Filament über. Einige Filamente begannen bereits kurz vor dem endgültigen Liegenbleiben mit der Produktion des Mannose-haltigen Bestandteils in der Glykokonjugat-Hülle, so dass die zurückgelassene Hülle des Bewegungsschleims sichtbar wurde (Abb. 3.11). Zur quantitativen Auswertung der Experimente wurde der Anteil der markierten und nicht-markierten *Nostoc* Filamente alle 60 Minuten bestimmt und in Abb. 3.9 graphisch dargestellt. Ein Vergleich mit den Experimenten zum Verlust der Bewegungsfähigkeit der Hormogonien (siehe Kap. 3.1.2) zeigte, dass sich die Zusammensetzung der äußeren Glykokonjugat-Hülle der *Nostoc*-Filamente im gleichen Zeitraum nach dem Beginn der Grünlicht-Beleuchtung veränderte, in welchem auch die Beweglichkeit der Cyanobakterien aufhörte (Abb. 3.9).

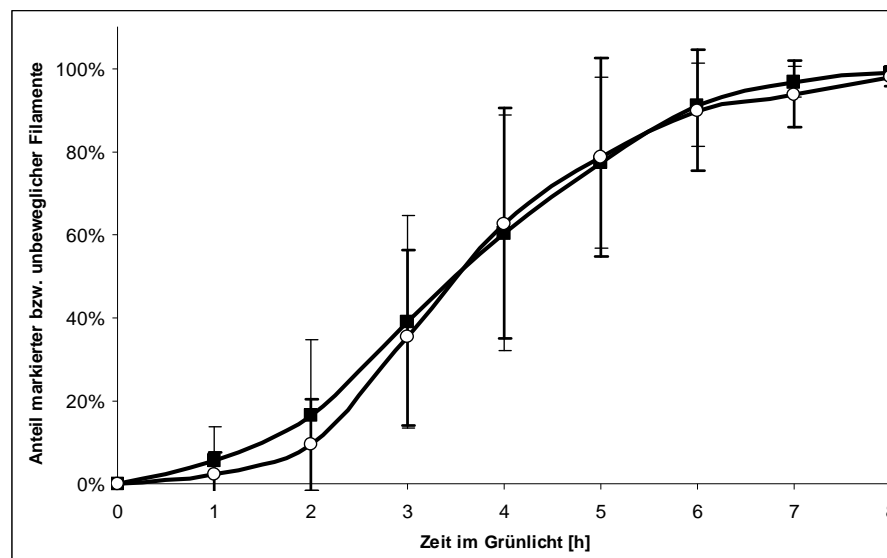


Abb. 3.9: Die Bildung des Mannose-haltigen Glykokonjugats an der Oberfläche der *Nostoc*-Filamente beginnt im gleichen Zeitbereich, in dem die Cyanobakterien ihre Bewegungsfähigkeit verlieren. Anteile an ConA-AlexaTM 488-markierten *Nostoc*-Filamenten (○, fette Fehlerbalken; n=7) und an unbeweglichen *Nostoc*-Filamenten (■, dünne Fehlerbalken; n=6; vgl. Kap. 3.2) ab Beginn der Grünlichtphase der Rot-Grün-Synchronisation.

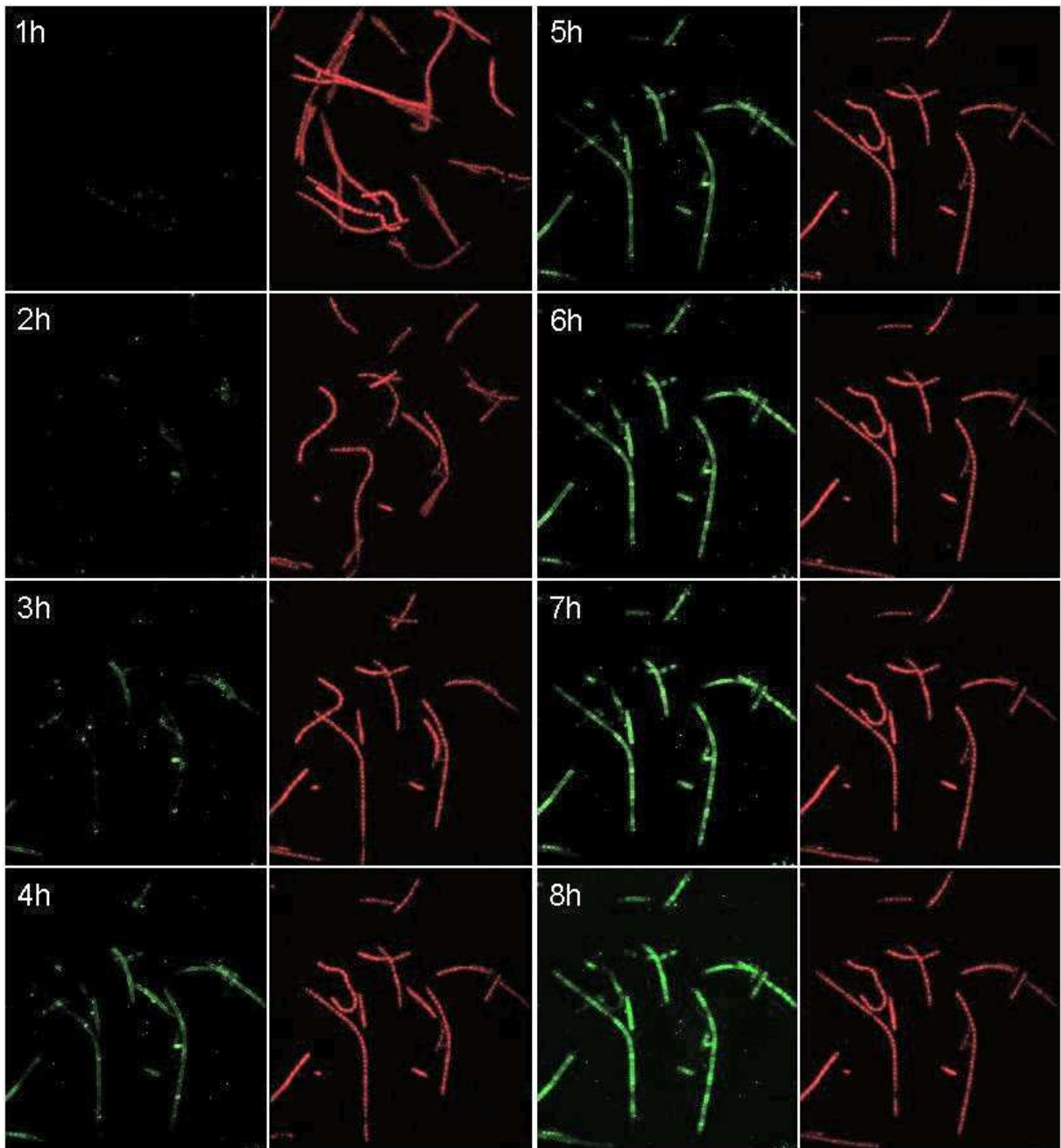
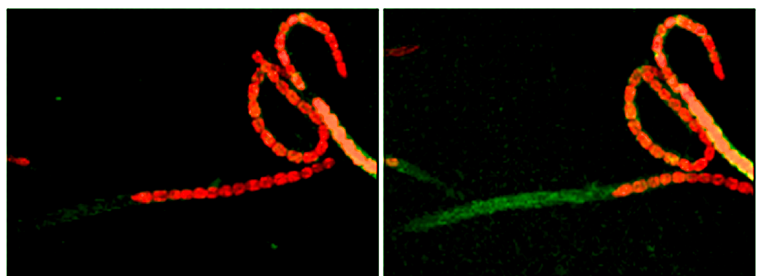


Abb. 3.10: Beginn der ConA-AlexaTM 488-Markierung von synchronisierten *Nostoc*-Filamenten. Da die Markierung zunächst nur schwach und in Überlagerungsbildern schwer zu erkennen ist, sind hier die beiden Detektionskanäle separat dargestellt. Kanal 1: Detektion des grünen ConA-AlexaTM 488 Signals (500 nm bis 560 nm), Kanal 2: Autofluoreszenz der Cyanobakterien (600 nm bis 690 nm).

Abb. 3.11: Kurz vor dem endgültigen Liegenbleiben (hier nach 3,5 und 4 Stunden im Grünlicht) beginnen bereits einige Filamente mit der Produktion des Mannose-haltigen Glykokonjugats, das in der zurückgelassenen Hülle von ConA-AlexaTM 488 angefärbt wird.



3.2.3 Diskussion

Mit der Timelapse-Funktion des CLSM lassen sich Bildstapel mit einer definierten Anzahl von Ebenen in vorgegebenen Zeitintervallen aufzeichnen. Mit einer vorsichtigen Lasereinstellung, die die Organismen nicht schädigt, können so Entwicklungsvorgänge lebender Organismen direkt im Mikroskop über viele Stunden kontinuierlich beobachtet und dokumentiert werden.

Durch die Rot-Grün-Synchronisation ist es möglich, die von Schüßler et al. (1997) beobachtete stadienspezifische Veränderung der Zusammensetzung des Oberflächenschleims der *Nostoc*-Filamente mit einer genaueren zeitlichen Auflösung zu untersuchen. Die Markierung der Oberflächenglykokonjugate durch das mit dem Fluoreszenzfarbstoff AlexaTM 488-gekoppelte Lektin ConA beginnt bei den ersten Filamenten mit zunächst schwacher Intensität nach etwa 2 bis 3 Stunden Grünlichtbeleuchtung. In den folgenden 3 bis 4 Stunden nimmt sowohl die Anzahl der markierten Filamente als auch die Intensität des Signals zu, bis nach 5 bis 7 Stunden alle Filamente eine ConA-Markierung zeigen. Die Intensität des Signals nimmt noch einige Stunden danach weiter zu, was ein Hinweis darauf ist, dass sich die Zusammensetzung der Schleimhülle langsam aber kontinuierlich verändert und ein, oder auch mehrere Mannose-haltige Glykokonjugate über einen längeren Zeitraum in der Hülle akkumulieren.

Der Vergleich mit dem Verlust der Beweglichkeit der *Nostoc*-Filamente nach der Rot-Grün-Synchronisation zeigt, dass die Veränderung in der Zusammensetzung des produzierten Hüllschleims im gleichen Zeitraum stattfindet, in welchem die Cyanobakterien ihre Bewegungsfähigkeit verlieren. Der Beginn der Markierung mit ConA kann als Indikator zur genaueren Charakterisierung der morphologisch nicht unterscheidbaren Übergangsstadien vom beweglichen Hormogonium zum frühen, unbeweglichen Primordium dienen.

4 Partnererkennung und Inkorporation

4.1 SÄTTIGUNGSEXPERIMENTE

4.1.1 Einführung

Cyanobakterien sind von einer Hülle aus extrazellulären Glykokonjugaten (Polysaccharide und Glykoproteine) umgeben (Jürgens & Weckesser, 1985; De Philippis et al., 2000; Hoiczyk & Hansel, 2000), deren Zusammensetzung sich bei dem hier verwendeten *Nostoc punctiforme*-Stamm in verschiedenen Stadien des Lebenszyklus unterscheidet (Schüßler et al. 1997). Wegen ihrer exponierten Position auf der Oberfläche der Organismen könnten Oligosaccharidreste der Glykokonjugate an der Erkennung zwischen Pilz und Cyanobakterium beteiligt sein. Lektine, Proteine mit einer hohen spezifischen Bindungsaffinität für Mono- oder Oligosaccharide, die jedoch weder Enzymfunktion besitzen noch Antikörper sind (Gabijs, 2000), spielen bei verschiedenen Zell-Zell-Interaktionen eine Rolle und werden bei Symbiosen als mögliche Vermittler symbiosespezifischer Erkennungsreaktionen angesehen (Sharon & Lis, 1989).

Mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Lektine konnten Schüßler et al. (1997) an dem auch in dieser Arbeit verwendeten *Nostoc punctiforme*-Stamm zeigen, dass sich die Glykokonjugate an der Oberfläche der Cyanobakterien im Verlauf des Lebenszyklus verändern. So enthält der Hormogonien-Schleim β -D-Galactosyl- und L-Fucosylreste, die in späteren Stadien nicht mehr auftreten. Dagegen wird ein α -D-Mannose- (oder α -D-Glucose-) haltiges Glykokonjugat an der Oberfläche der Cyanobakterien beim Übergang vom Hormogonien- zum Primordien-Stadium gebildet, welches durch das fluoreszenzmarkierte Lektin Concanavalin A (ConA; bindet spezifisch an terminale α -D-Mannosyl- und mit geringerer Affinität auch α -D-Glucosylreste) angefärbt wird. In CLSM-Studien an lebenden *Nostoc*-Filamenten wurde das Auftreten dieses Glykokonjugats bei synchronisierten *Nostoc* in genauerer zeitlicher Auflösung verfolgt (siehe Kap. 3.2). In der Übergangsphase vom Hormogonium zum Primordium im Lebenszyklus der *Nostoc* finden bereits erste Erkennungsreaktionen zwischen Pilzhyphe und Cyanobakterium statt (siehe Kap. 4.2). Deshalb wurde überprüft, ob die Zugabe von Mannose oder Glucose zur Sättigung möglicher Lektinbindestellen führt und damit einen Einfluss auf die Partnererkennung hat. Auch Galactose und Fucose sowie einige weitere Mono- und Disaccharide und die Lektine ConA und WGA (Wheat Germ Agglutinin, bindet spezifisch an N-Acetylglucosamin (β -1,4)_n) wurden in Sättigungsansätzen auf einen möglichen Einfluss bei der Partnererkennung untersucht.

4.1.2 Methode

Für die Sättigungsexperimente wurden *Geosiphon*-Blasen wie in Kap. 2.2.2 beschrieben präpariert und jeweils 5 Blasen zusammen mit kleinen Stücken einer flächig gewachsenen Kultur von *Nostoc punctiforme* 1:1-26 in 2 ml GM32 in die Vertiefungen einer 24-Loch Zellkultur-Testplatte (Tissue culture multi-well plate, Linbro® Flow Laboratories) überführt. Dem Medium wurde jeweils die zu testende Konzentration eines Mono- oder Disaccharids bzw. des entsprechenden Lektins zugesetzt. Die Ansätze wurden zum Vorkeimen 1-2 Tage mit Grünlicht bestrahlt. Anschließend wurde durch 36-stündige Beleuchtung mit Rotlicht die Differenzierung von Hormogonien ausgelöst. Nach 11 bis 14 Tagen in Dauergrünlicht oder im Licht/Dunkel-Rhythmus wurde unter dem Mikroskop (Objektiv 10x) zunächst ausgezählt, wie viele der eingesetzten Blasen neu ausgekeimt waren. Dann wurde die Anzahl der sich an den neuen Hyphen bildenden jungen Blasen als Index für erfolgte Partnererkennung bestimmt. Zwischendurch wurde alle 2 bis 4 Tage das Medium ausgewechselt, um zu verhindern, dass die Zuckerkonzentration durch andere im unsterilen Ansatz vorhandene Mikroorganismen herabgesetzt wird.

4.1.3 Ergebnisse

Wie ein Vergleich der Anteile der neu ausgekeimten Blasen und der Blasen mit Erkennungsstadien bei den Kontrollversuchen ohne Zugabe eines Zuckers zeigt, unterlag die quantitative Ausbeute bei den einzelnen Experimenten starken Schwankungen (Abb. 4.1 und Abb. 4.2). Leider stand oft nur eine begrenzte Menge an *Geosiphon*-Blasen aus der Kultur zur Verfügung, so dass diese Experimente nicht entsprechend oft wiederholt werden konnten. Bei einigen Versuchen fand auch in den Kontrollen keine Blasenkeimung oder keine Hormogonienbildung statt, so dass die Gesamtzahl der auswertbaren Experimente für einige Zucker nicht ausreicht, um eine quantitative Aussage zu ermöglichen.

In Abb. 4.3 sind junge Blasen gezeigt, die sich in Ansätzen mit 20 mM Methyl- α -D-Mannopyranosid (Me-Man)- und Methyl- α -D-Glucopyranosid (Me-Glc)-Lösung entwickelt haben. Bei den Sättigungsexperimenten mit Me-Man und Me-Glc in Konzentrationen von 10 mM, 20 mM und 50 mM unterschieden sich weder der Anteil keimfähiger Blasen noch der Anteil an Blasen, die Erkennungsstadien bildeten, signifikant von den Kontrollversuchen ($p > 0,05$, für 20mM Me-Glc $p = 0,028$). In der Anzahl der Erkennungsstadien pro gekeimte Blase gab es ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Me-Man- und Me-Glc-Ansätzen und den Kontrollen (jeweils $p > 0,05$; Abb. 4.1). Auch das in CLSM-Studien häufig zur Fluoreszenzmarkierung der lebenden Organismen verwendete Lektin ConA sowie das Lektin WGA hatten in Konzentrationen zwischen 5 und 10 $\mu\text{g/ml}$ keine hemmende Wirkung auf die Bildung von Erkennungsstadien (siehe Kap. 4.2.4).

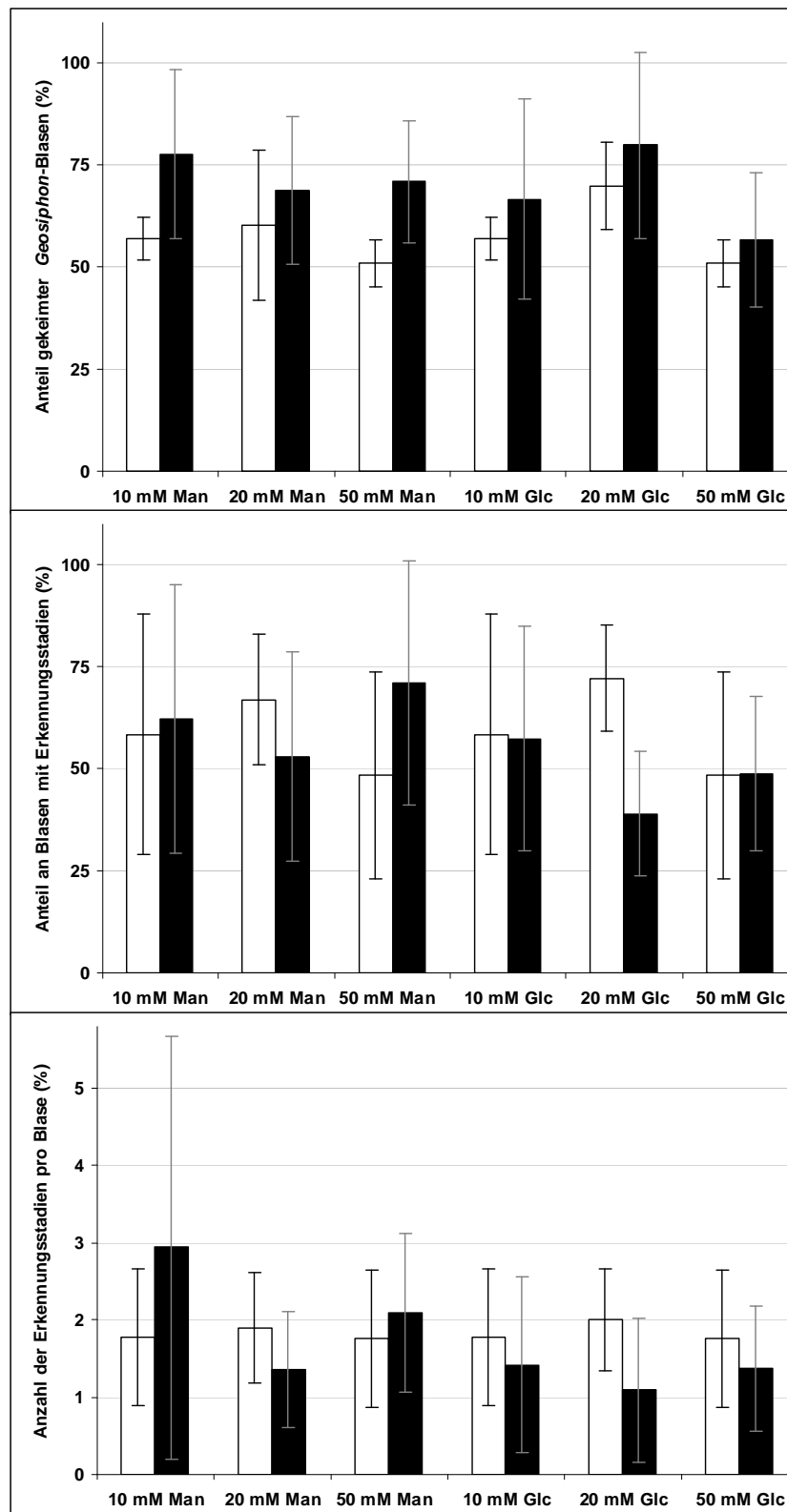


Abb. 4.1: Sättigungsexperimente mit verschiedenen Konzentrationen von Methyl- α -D-Mannopyranoside (Man) und Methyl- α -D-Glucopyranoside (Glc). Weiße Balken: Kontrollen in GM32; schwarze Balken: Sättigungsansätze. 10 mM Man: n=3, 20 mM Man: n=7, 50 mM Man: n=3, 10 mM Glc: n=3, 20 mM Glc: n=4, 50 mM Glc: n=3.

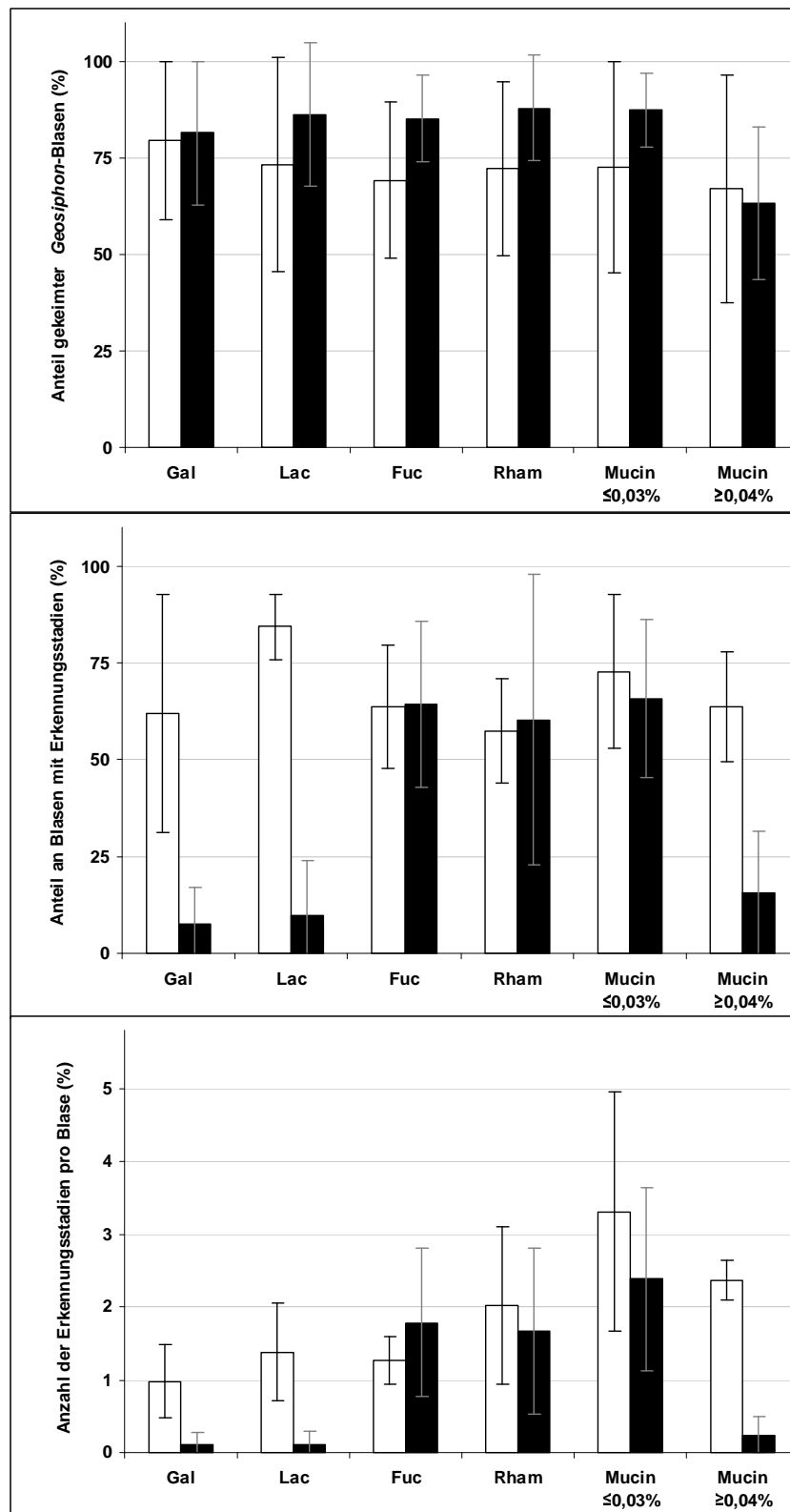


Abb. 4.2: Sättigungsexperimente mit Galactose (Gal, n=7), Lactose (Lac, n=5), Fucose (Fuc, n=5) und Rhamnose (Rham, n=4) in einer Konzentration von 20 mM und mit Mucin. Die Mucin-Ansätze der Konzentrationen 0,01%, 0,02% und 0,03% sowie Ansätze der Konzentrationen 0,04%, 0,05%, 0,06% und 0,08% wurden zusammengefasst (jeweils n=7). Weiße Balken: Kontrollen in GM32; schwarze Balken: Sättigungsansätze. Bei Galactose, Lactose und den Mucin-Konzentrationen ab 0,04% ist der Anteil an Blasen mit Erkennungsstadien und die Anzahl der Aufnahmen signifikant geringer als in den Kontrollen.

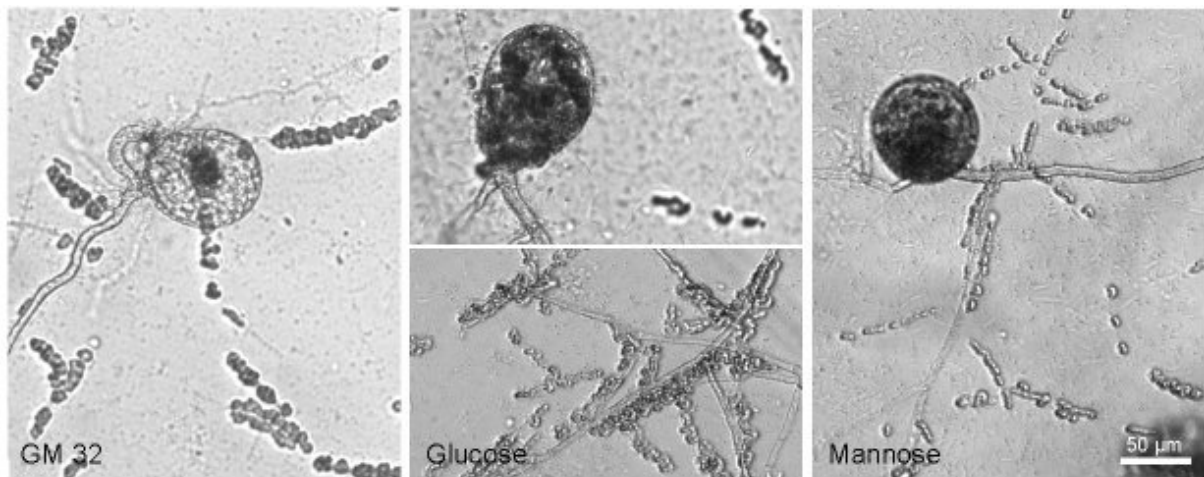


Abb. 4.3: Junge Blasen, ca. 10 Tage alt, in GM32 und in Ansätzen mit 20 mM Methyl- α -D-Glucopyranosid- und Methyl- α -D-Mannopyranosid-Lösungen. Es findet auch in Anwesenheit der Zucker eine Erkennung der Symbiosepartner statt, die entstehenden Blasen unterscheiden sich nicht von denen der Kontrolle.

Weiterhin wurden folgende Mono- und Disaccharide, die im Schleim von Cyanobakterien gefunden wurden (Mehta & Vaida, 1978; Cupać & Gantar, 1992; Hoiczky & Hansel, 2000), in einer Konzentration von 20 mM in Sättigungsansätzen getestet: D-Galactose, L(-)-Fucose, D-Ribose, L(+)-Rhamnose, D(+)-Lactose, sowie zusätzlich Maltose und D(+)-Cellobiose. Bei Ansätzen mit Ribose, Maltose und Cellobiose wurde keine Hemmung der Erkennung beobachtet, Aufnahmestadien und neue Blasen bildeten sich wie in den Kontrollen, allerdings war bei diesen Versuchen keine quantitative Auswertung möglich. Fucose und Rhamnose hatten ebenfalls keine signifikante Wirkung auf die Blasenkeimung und die Anzahl neuer Aufnahmestadien (jeweils $p > 0,05$; Abb. 4.2).

In Experimenten mit 20 mM Galactose und mit 20 mM Lactose traten jedoch im Vergleich zu den Kontrollversuchen signifikant geringere Anteile an Blasen mit Erkennungsstadien auf ($p = 0,0014$ für Galactose, $p < 0,0001$ für Lactose; Abb. 4.2). Auch die Anzahl der Erkennungsstadien pro gekeimte Blase war signifikant niedriger als in den Kontrollen (Galactose: $p = 0,0017$, Lactose: $p = 0,0062$). Die Blasen keimten in beiden Ansätzen in gleichem Maße wie in den Kontrollen (kein signifikanter Unterschied, $p > 0,05$). Die *Nostoc*-Zellen wirkten in Ansätzen mit Galactose etwas weniger vital und bildeten eher knäuelige Formen (Abb. 4.4), während *Nostoc* in den Parallelansätzen als Zellfäden oder in der für Primordienstadien typischen Zickzackanordnung der Zellen im Filament vorlagen. Bei ersten Versuchen mit Melibiose, einem Disaccharid, das ebenso wie Lactose aus Galactose und Glucose besteht, allerdings in $\alpha(1,6)$ -glykosidischer Bindung, trat dagegen keine Hemmung der Inkorporation auf.

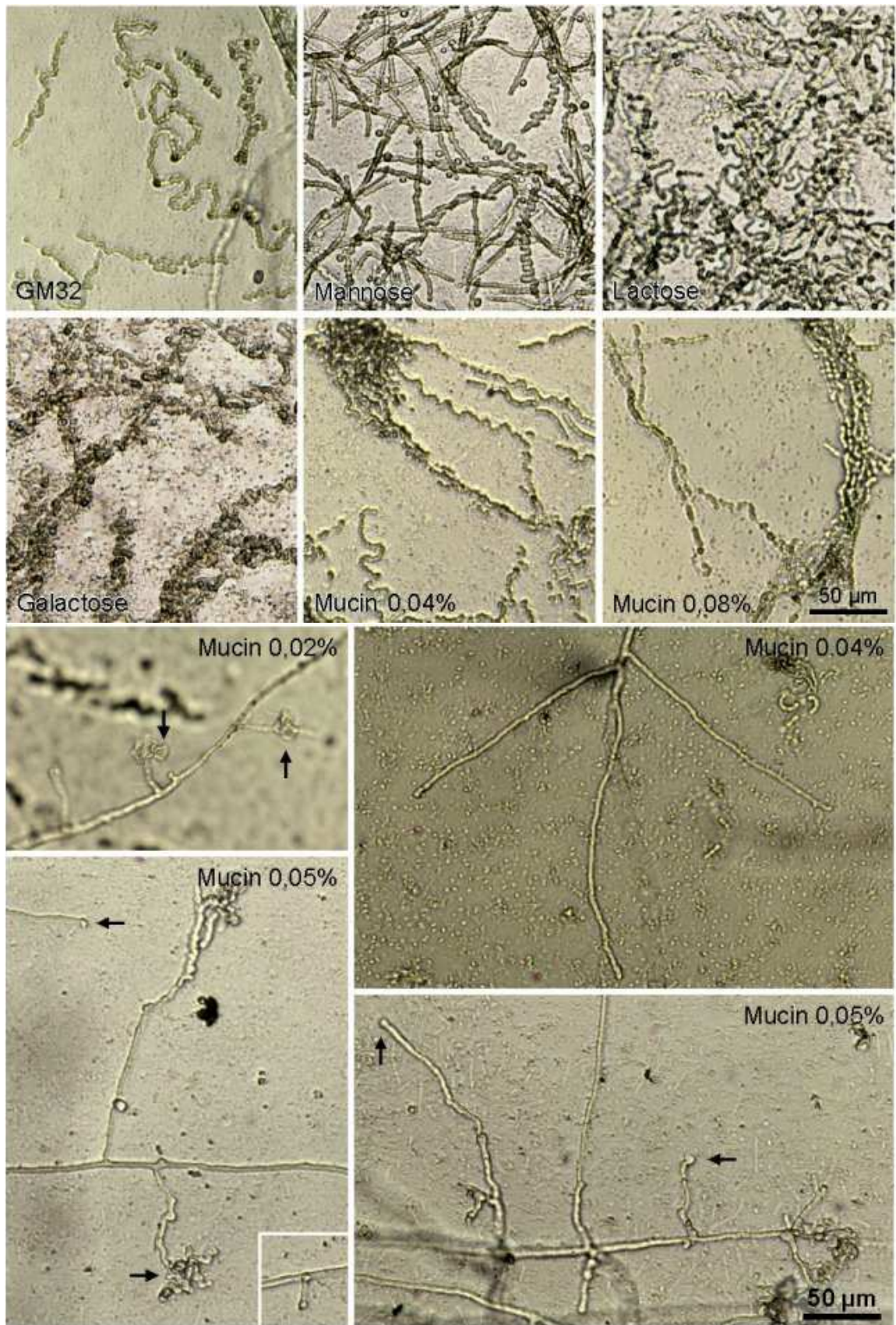


Abb. 4.4: Wachstum von *Nostoc* und *Geosiphon*-Hyphen nach 9 Tagen in verschiedenen Sättigungsansätzen mit 20 mM Zuckerlösungen und verschiedenen Mucin-Konzentrationen. Die Pfeile kennzeichnen angeschwollene Hyphen in verschiedenen Mucin-Ansätzen.

Das hochmolekulare Glykoprotein Mucin, dessen Zuckerreste bis zu 50% des Molekulargewichtes ausmachen, wurde ebenfalls auf eine Wirkung bei der Erkennung untersucht. Für die Versuche wurde Bovine Submaxillary Gland Mucin Type I-S (Sigma) verwendet. Es enthält zu 12% Sialinsäure (N-Acetylneuraminsäure), aber auch N-Acetylgalactosamin und N-Acetylglucosamin sowie Anteile an D-Galactose und L-Fucose in Oligosaccharidketten mit großer struktureller Diversität (Mårtensson et al., 1998; Hounsell, 1994; Fischer, 1992). Die Ergebnisse sind in Abb. 4.2 dargestellt. Bei Konzentrationen bis 0,03% Mucin unterschieden sich weder der Anteil gekeimter Blasen noch der Anteil an Blasen mit Aufnahmestadien oder die Anzahl der Aufnahmestadien pro Blase von denen der Kontrollversuche ($p > 0,05$). Ab 0,04% Mucin war dagegen der Anteil an Blasen mit Erkennungsstadien ($p = 0,0038$) und die Anzahl der Aufnahmestadien pro Blase ($p = 0,0001$) signifikant niedriger, während sich der Anteil keimfähiger Blasen ($p > 0,05$) nicht von dem der Kontrollen unterschied. Auffällig war allerdings bei den Mucin-Ansätzen ein häufigeres Auftreten von Hyphenspitzen mit ungewöhnlichen Formen neben völlig normal wachsenden Hyphen. Solche angeschwollenen, zum Teil in alle Richtungen aufquellenden Hyphenspitzen, die bei anderen Ansätzen nur selten beobachtet wurden, traten in unterschiedlich konzentrierten Mucin-Ansätzen auf (Abb. 4.4).

4.1.4 Diskussion

Die *Geosiphon*-Blasen zeigten bei den einzelnen Versuchen eine sehr unterschiedliche Vitalität. Das war zum einen an der Überlebensrate der Blasen in den Ansätzen nach der Präparationsprozedur zu erkennen, zum anderen am Anteil der *Geosiphon*-Blasen, die in den Kontrollen junge Blasen ausbildeten (vgl. Kontrollansätze in Abb. 4.1 und Abb. 4.2). Das unterschiedliche Verhalten kann zum Teil auf die unterschiedliche Vitalität der *Geosiphon*-Kulturen zurückgeführt werden, die für die verschiedenen Versuche abgeerntet wurden. Durch die Verwendung von autoklavierter Erde vom natürlichen Standort für die *Geosiphon*-Kultur können trotz guter Durchmischung der Erde in den einzelnen Kulturansätzen Unterschiede hinsichtlich der Nährstoffversorgung bestehen. Auch das Wachstum der Cyanobakterien in den einzelnen *Geosiphon*-Kulturen war unterschiedlich stark, was ebenfalls auf eine unterschiedliche Verfügbarkeit von Nährstoffen zurückschließen lässt. War die Versorgung mit Nährstoffen zu hoch, vermehrten sich die Cyanobakterien zu schnell und überwucherten die *Geosiphon*-Blasen. Einige *Geosiphon*-Kulturen zeigten über einen Zeitraum von einigen Monaten ein kontinuierliches Wachstum, bei anderen trat eine Art „Blüte“ auf, nach der die Kultur zusammenbrach. Die unterschiedliche Vitalität der für die Versuche verwendeten Blasen könnte somit auch von der jeweils verwendeten Kultur und dem Zeitpunkt der Blasenernte (z.B. kurz vor einem Zusammenbruch) abhängen. Eine jahreszeitliche Abhängigkeit der *Geosiphon*-Kultur konnte nicht festgestellt werden.

Ein zweites Problem stellten die den Versuchsansätzen zugegebenen Cyanobakterien von Kulturen auf Cellophan-Agarplatten dar, die trotz Auswaschens und Rotlichtbestrahlung in einigen Versuchen keine oder nur wenige Hormogonien ausbildeten. Unterschiede in der Feuchtigkeitsversorgung oder in der Lichtmenge durch verschiedene Standorte im Kulturschrank könnten eine unterschiedliche Entwicklung der Cyanobakterien bei verschiedenen Agarplatten bedingen. Es ist ebenfalls möglich, dass *Nostoc* von verschiedenen Stellen auf der gleichen Platte anders reagieren, da die Cyanobakterien in der Mitte einer Kolonie älter sind als am Rand. Es wurde darauf geachtet, *Nostoc* aus dem gleichen Bereich einer Kolonie für ein Experiment zu verwenden, bei großen Ansätzen wurden jedoch wegen der benötigten Menge auch größere Bereiche einer Kolonie entnommen.

Einen weiteren Faktor, der das Wachstum von *Geosiphon* in den Sättigungsansätzen beeinflusst haben könnte, stellte die Vermehrung von Mikroorganismen in dem relativ kleinen Ansatzvolumen dar. Bakterien stammten wahrscheinlich zumindest zum Teil aus der *Geosiphon*-Kultur, die nicht monoxenisch ist. Sie konnten aber auch während der aus technischen Gründen unter unsterilen Bedingungen erfolgenden Präparation der Blasen eingeschleppt werden. Das Wachstum dieser Mikroorganismen könnte durch den Zuckerzusatz in den Ansätzen unterschiedlich stark gefördert worden sein, und möglicherweise ins Medium abgegebene Substanzen könnten das Wachstum der Blasen oder auch der Cyanobakterien beeinflusst und damit evtl. vorhandene Wirkungen der Zucker überdeckt haben. Obwohl noch gewisse Unwägbarkeiten bei der Kultur von *Geosiphon* auftraten, zeigen die Ergebnisse der Sättigungsexperimente doch Trends hinsichtlich einer möglichen Beteiligung der Zucker an der Erkennung.

Die Veränderung der Glykokonjugate an der Oberfläche der Cyanobakterien zu dem Zeitpunkt, ab dem die Erkennung zwischen den beiden Symbiosepartnern stattfindet (Kap. 4.2), gibt Anlass zu der Vermutung, dass solche Glykokonjugate an der Erkennungsreaktion beteiligt sein könnten. Schüßler et al. (1997) beschrieben das Auftreten eines durch das Lektin ConA anfärbbaren Glykokonjugates an der Oberfläche von *Nostoc*-Primordien, während Hormogonien keine Färbung zeigten. Der Zeitpunkt des Auftretens dieses Mannose-haltigen Glykokonjugats wurde durch CLSM-Studien in der vorliegenden Arbeit (siehe Kap. 3.2) genauer untersucht. Die Bildung des Glykokonjugats beginnt genau zu dem Zeitpunkt, zu dem erste Erkennungsreaktionen stattfinden. Da ConA spezifisch an Methyl- α -D-Mannopyranosid-Reste, zu einem geringen Anteil auch an Methyl- α -D-Glucopyranosid-Reste bindet, wurde untersucht, ob die Zugabe dieser Monosaccharide zum Medium einen Einfluss auf den Erkennungsprozess hat. In den Sättigungsexperimenten konnte jedoch auch bei hohen Konzentrationen weder eine fördernde noch eine hemmende Wirkung auf den durch Neubildung von Blasen erfassten Erkennungsprozess festgestellt werden. Auch die Zugabe des Lektins ConA hatte keine Auswirkung auf den Erkennungsprozess. Damit ist unwahrscheinlich, dass Mannose oder Glucose selbst direkt am Erkennungsprozess beteiligt sind.

Allerdings ist es möglich, dass andere Kohlenhydratreste oder Oligosaccharide des mit ConA anfärbbaren Glykokonjugats bei der Erkennung eine Rolle spielen.

Bei den außerdem untersuchten Mono- und Disacchariden wurde eine hemmende Wirkung von Galactose und Lactose (Galactose- β (1,4)-Glucose) auf die Bildung von Blasen beobachtet. Das Glykoprotein Mucin, das v.a. N-Acetylneuraminsäure aber auch Galactose in β (1,3)- und β (1,4)-glykosidischen Bindungen in verschiedenen Oligosacchariden enthält (Mårtensson et al, 1998), bewirkte schon bei niedrigen Konzentrationen einen hemmenden Effekt. Bei Konzentrationen zwischen 0,04% und 0,08% Mucin bildeten deutlich weniger Blasen Aufnahmestadien aus als in den Kontrollen und den Ansätzen mit Konzentrationen unter 0,04%, obwohl das Wachstum der Hyphen und der *Nostoc*-Filamente vergleichbar war. Auffällig war auch das häufige Vorkommen angeschwollener und sich scheinbar in mehrere Richtungen gleichzeitig verzweigender Hyphenspitzen in den Mucin-Ansätzen. Die übrigen untersuchten Zucker zeigten keinen hemmenden Einfluss auf die Bildung neuer Blasen. Auch in ersten Experimenten mit Melibiose, einem Disaccharid aus Galactose- α (1,6)-Glucose, fand keine Hemmung der Inkorporation statt. Ein durch das Lektin RCA-120 (*Ricinus communis* Agglutinin I) anfärbbares Glykokonjugat wurde von Schüßler et al. (1997) im Bewegungsschleim der Hormogonien gefunden, fehlte jedoch im Schleim der Primordienstadien. RCA-120 bindet spezifisch an terminale β -D-Galactosyl-Reste. Eine Bindung des Lektins BS-I-B₄ (*Bandeiraea simplicifolia* Lektin I Isolektin B₄), das spezifisch α -Galactosyl-Reste bindet, wurde von Schüßler et al. (1997) dagegen nicht beobachtet. Die in den Sättigungsexperimenten festgestellte Hemmung der Bildung neuer Blasen durch Galactose, Lactose und Mucin könnte somit ein Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von β -glykosidisch gebundener Galactose an der Erkennungsreaktion sein. Dies deutet auch auf einen von Schüssler et al. (1997) bereits vermuteten Lektin-vermittelten Mechanismus der Erkennung hin. Bei Mucin könnten allerdings auch andere Komponenten des Glykoproteins, wie die in hohem Anteil vorkommende Sialinsäure, für die Hemmung verantwortlich sein. Ob die hier beobachtete verringerte Anzahl der Erkennungsstadien tatsächlich auf einem Eingriff von β -Galactose in den Erkennungsmechanismus beruht oder ob Galactose auf andere Weise ungünstige Lebensbedingungen etwa für den Cyanobakterienpartner verursacht, muss durch weitere Untersuchungen noch geklärt werden.

Ein unterschiedlicher pH-Wert der Zuckerlösungen könnte ebenfalls eine Ursache für eine schlechtere Entwicklung von *Nostoc* oder von Blasen sein. Ein Vergleich der 20 mM Zuckerlösungen ergab pH-Werte zwischen 5,0 und 6,0, wobei Lactose mit 4,85 und Galactose mit 6,2 die extremsten Werte darstellen (siehe Kap. 2.1.3.2). Diese Werte liegen jedoch in einem sowohl für die Cyanobakterien als auch für *Geosiphon* verträglichen Bereich, wie Kulturversuche mit *Geosiphon*-Medium von pH4,5 und pH6 zeigten.

Die hier dargestellten Versuche zu einer möglicherweise durch Lektine vermittelten Partnererkennung sollten einen ersten Überblick über die Reaktion der *Geosiphon*-Symbiose auf sättigende Zuckerkonzentrationen im Medium geben. Da die Experimente noch mit einigen Unwägbarkeiten behaftet sind, können die Ergebnisse nur als Hinweise gewertet werden. Optimale Bedingungen zur Untersuchung der Etablierung einer Symbiose herzustellen, ist schwierig, da einerseits nicht nur zwei verschiedene Symbiosepartner kultiviert werden müssen, sondern auf der anderen Seite auch die Bedingungen zu ermitteln sind, unter denen sich die Symbiose ausprägt. Letztere Bedingungen sind meist nicht identisch mit den für die einzelnen Partner geltenden Optima. Um mit Sättigungsexperimenten aussagekräftigere Ergebnisse zu erhalten, muss für beide Organismen eine stabile Kultur vorliegen, damit eine Reproduzierbarkeit von Kontrollversuchen gewährleistet ist, auch wenn verschiedene Ausgangskulturen verwendet werden. Außerdem muss ein Einfluss von Bakterien und anderen Mikroorganismen ausgeschlossen werden.

4.2 PARTNERERKENNUNG UND INKORPORATION VON *NOSTOC*

Die aufeinanderfolgende Rot- und Grünbeleuchtung der Cyanobakterien stellt eine Methode dar, mit der eine synchrone Differenzierung der Entwicklungsstadien im Lebenszyklus der Cyanobakterien ausgelöst werden kann. Mit dieser Methode kann das zur Erkennung durch den Pilz kompetente Stadium im *Nostoc*-Lebenszyklus genauer charakterisiert werden. Die zur Etablierung jeder *Geosiphon*-Blase erneut stattfindende Partnererkennung wurde von der ersten mikroskopisch sichtbaren Reaktion des Pilzes über den Prozess der Inkorporation der *Nostoc*-Zellen in die Pilzhyphe bis zur Ausbildung der jungen *Geosiphon*-Blase sowohl lichtmikroskopisch als auch am CLSM dokumentiert.

4.2.1 Methode

Zur mikroskopischen Untersuchung der Partnererkennung und des Inkorporationsprozesses wurden *Geosiphon*-Blasen, wie in Kap. 2.2.2 beschrieben, präpariert. 10 bis 15 einzelne Blasen wurden zusammen mit kleinen Stücken vegetativer *Nostoc*-Thalli des Stammes 1:1-26 in eine Filterkammer (siehe Kap. 2.4.1) mit 3 ml GM32 oder GM33 (siehe Kap. 2.2.1.1) gegeben. Es wurden keine Unterschiede zwischen den beiden Medien bei diesen Flüssigkulturen festgestellt. Die Blasen mit den Cyanobakterien wurden dem in Kap. 3.1.2.2 beschriebenen Rot-Grün-Lichtwechsel zur Synchronisation des *Nostoc*-Lebenszyklus ausgesetzt. Bei einigen Versuchen wurde eine 2-tägige Grünlichtphase vorgeschaltet, um eine größere Anzahl neuer Pilzhypen zu erhalten und damit die Anzahl potentieller Inkorporationsstellen zu erhöhen. Wie in Kap. 3.1.2 beschrieben, führte dies zur Bildung von Stadiengemischen der Cyanobakterien, an denen aber dennoch Beobachtungen zur Inkorporation durchgeführt werden konnten.

Zunächst wurde geprüft, ob sich Inkorporationen innerhalb des synchronisierten Lebensabschnitts im Entwicklungszyklus der Cyanobakterien ereignen. Es wurde sowohl im Lichtmikroskop als auch im CLSM untersucht, welches Stadium im Verlauf des *Nostoc*-Lebenszyklus vom Pilzpartner erkannt und aufgenommen wird. Um ein genaueres Bild des Aufnahmeprozesses zu erhalten, wurden Erkennungsstadien mit dem fluoreszenzmarkierten Lektin ConA-AlexaTM 488 oder mit einem Mucin-Oregon Green[®] 488-Konjugat angefärbt und die weitere Entwicklung zu jungen *Geosiphon*-Blasen am CLSM beobachtet.

4.2.2 Erste Erkennungsstadien im Lichtmikroskop

Wie in Kap. 3.1.2 beschrieben, bildete *Nostoc* im Rotlicht Hormogonien aus, die sich über das Deckglas verteilen. Die Bewegung der Hormogonien hörte zwischen 3 und 7 Stunden nach dem Beginn der folgenden Grünlichtphase auf. Die *Geosiphon*-Blasen keimten während der Rotlichtphase aus und bildeten meist genügend neue Hyphen aus, die potentielle Inkorporationsorte darstellen. Es wurde keine Beeinträchtigung des Hyphenwachstums von *Geosiphon* durch die Rot- und Grünlichtbeleuchtung festgestellt, das Lichtwechselschema zur Synchronisation der Cyanobakterien konnte daher für die Inkorporationsversuche übernommen werden. Die lichtmikroskopische Beobachtung der wachsenden Hyphenspitzen ab dem Beginn der Grünlichtbeleuchtung zeigte, dass nach acht Stunden im Grünlicht die ersten mikroskopisch sichtbaren, morphologischen Veränderungen auftraten, mit denen die Inkorporation eines *Nostoc*-Filaments in eine Hyphenspitze beginnt (Abb. 4.5 A). Neu entstandene Aufnahmestadien wurden bis über 16 Stunden nach Beginn der Grünlichtbeleuchtung gefunden (Abb. 4.5 B und Abb. 4.6). Bei den ersten, nach 8 bis 9 Stunden auftretenden Stadien waren bereits deutliche morphologische Veränderungen an der Spitze der Pilzhyphe sichtbar, die eigentliche Erkennungsreaktion zwischen der Pilzhyphe und dem *Nostoc*-Filament musste diesem Stadium also bereits vorausgegangen sein. Da eine Inkorporation erst mit dem Liegenbleiben der Hormogonien beginnen konnte, ließ sich der Beginn des zur Erkennung fähigen *Nostoc*-Stadiums etwa auf den Zeitraum zwischen 4 und 8 Stunden nach Beginn der Grünlichtbeleuchtung schätzen. Das für die Erkennung durch den Pilzpartner kompetente *Nostoc*-Stadium lag also bereits direkt nach dem durch den Verlust der Bewegungsfähigkeit gekennzeichneten Ende des Hormogonien-Stadiums vor. Die Synchronisation der *Nostoc*-Stadien konnte damit in Anwesenheit wachsender *Geosiphon*-Hyphen gezielt zur Induktion von Inkorporationsstadien genutzt werden. Damit stand eine Methode zur genaueren Untersuchung solcher Stadien und des gesamten Inkorporationsprozesses zur Verfügung.

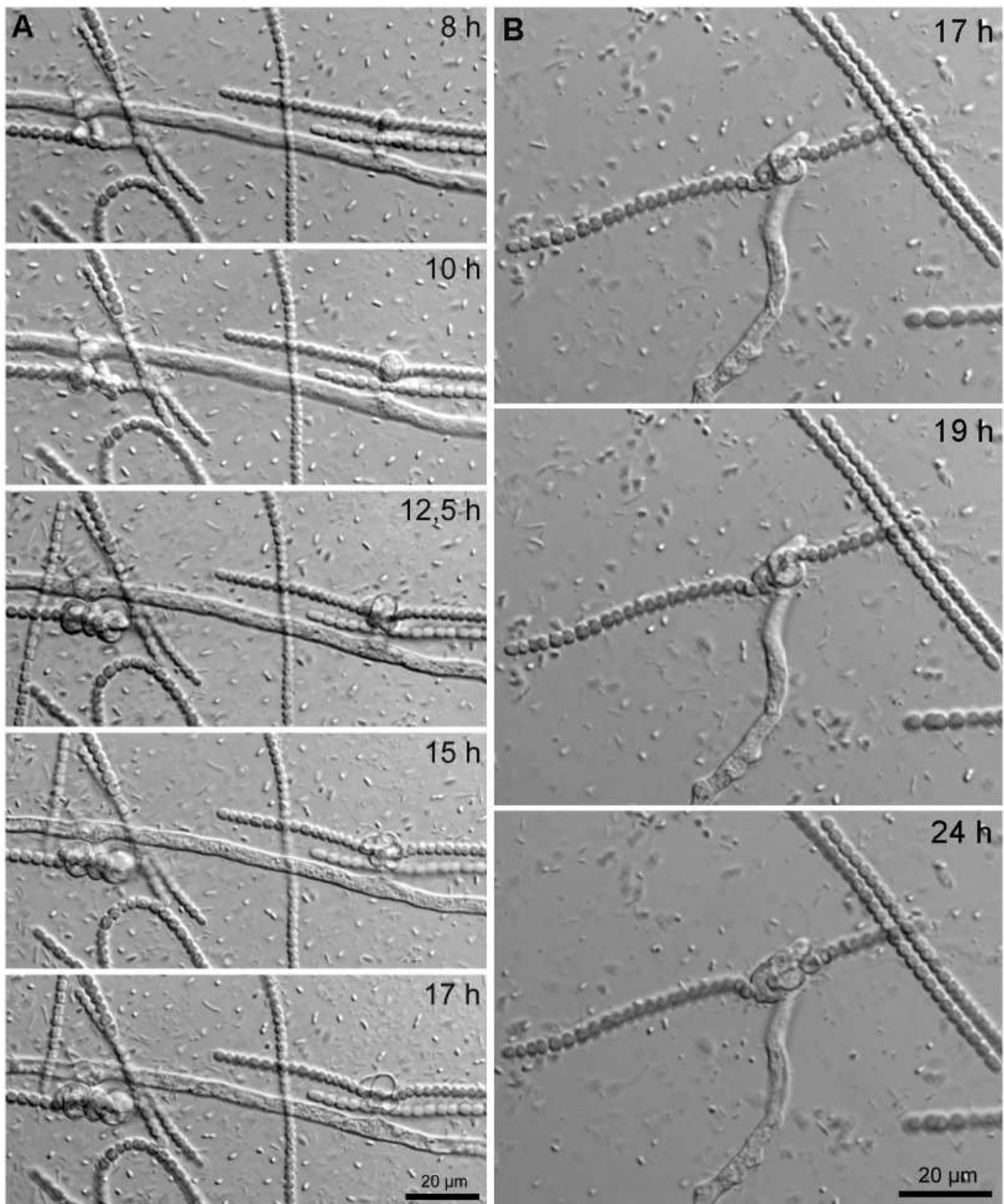


Abb. 4.5: **A:** Nach 8 Stunden im Grünlicht haben bereits erste Erkennungsreaktionen stattgefunden. Das *Nostoc*-Filament auf der linken Bildseite wird gleichzeitig von oben und unten vom Pilz eingeschlossen. Auf der rechten Bildseite hat die Erkennung bereits stattgefunden. Nach 15 Stunden beginnt hier allerdings aus ungeklärter Ursache das Pilzplasma sich zurückzuziehen, und die Hyphe stirbt ab. **B:** Frühes Inkorporationsstadium nach 17 Stunden im Grünlicht. Hier ist bereits eine *Nostoc*-Zelle vom Pilz eingeschlossen, die Inkorporation wird in den folgenden Stunden zu beiden Seiten hin fortgesetzt.

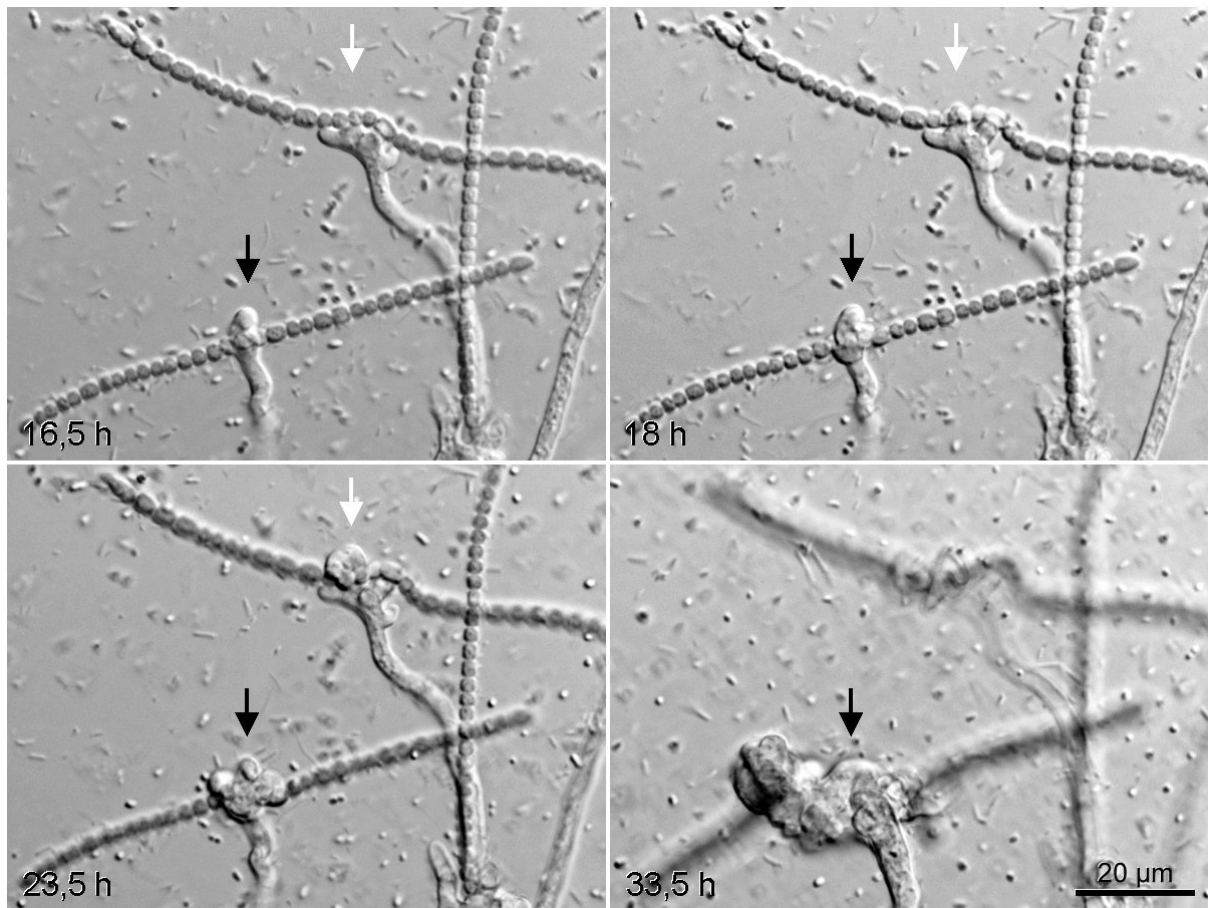


Abb. 4.6: Das obere der beiden Erkennungsstadien (weißer Pfeil) zeigt die morphologische Reaktion des Pilzpartners nach der Erkennung eines kompetenten *Nostoc*-Filaments. An mehreren Stellen kurz unterhalb der Hyphenspitze entstehen neue Wachstumsspitzen, die sich zu fingerförmigen Strukturen entwickeln. Bei dem zweiten Stadium (schwarzer Pfeil) schließt der Pilz zunächst eine *Nostoc*-Zelle ein, dann wird die Inkorporation auf die seitlich folgenden Zellen ausgedehnt. Durch das Anschwellen der Hyphe und die Bildung neuen Pilzmaterials bekommt die Struktur ein beerenförmiges Aussehen.

4.2.3 Erkennungsstadien im CLSM

Die Erkennung und der Inkorporationsprozess wurden im CLSM nach Zugabe von Fluoreszenzfarbstoffen untersucht. Wie von Schüßler et al. (1997) und in Kap. 3.2 gezeigt wurde, werden nur im Oberflächenschleim von Primordien-Stadien ein oder mehrere Mannose-haltige Glykokonjugate gebildet. Das fluoreszenzmarkierte Lektin ConA wurde daher zur Untersuchung der Erkennungsstadien verwendet. Da bei Sättigungsexperimenten ein hemmender Effekt von Mucin auf die Bildung junger Blasen beobachtet wurde (siehe Kap. 4.1), wurden auch Versuche mit fluoreszenzgekoppeltem Mucin durchgeführt. Mucin enthält verschiedene Kohlenhydrate in unterschiedlicher Anordnung (Mårtensson et al., 1998; Hounsell, 1994; Fischer, 1992), die potentiell mit Lektinen der Pilzzellwand oder des *Nostoc*-Schleims interagieren könnten. Die Farbstoffe wurden jeweils zum Beginn der Grünlichtphase

zugegeben. Bei diesen Experimenten traten ebenfalls nach 8 bis 9 Stunden Grünlichtbeleuchtung erste sichtbare Reaktionen auf. Durch die Erstellung optischer Schnitte am CLSM ist hier genauer als an lichtmikroskopischen Bildern zu sehen, ob tatsächlich Kontakt zwischen einer Hyphe und einer *Nostoc*-Zelle besteht und ob Zellen bereits vollständig von Pilzmaterial umgeben sind. Neben Experimenten zur Charakterisierung des kompetenten Stadiums im Laufe des synchronisierten *Nostoc*-Lebenszyklus wurden auch Langzeitbeobachtungen zur Verfolgung des Prozesses der Inkorporation durchgeführt. Dabei traten auch Erkennungsreaktionen mit fortgeschritteneren Stadien im Lebenszyklus von *Nostoc* auf. Diese wurden nach morphologischen Gesichtspunkten charakterisiert, da eine auf der Grünlicht-Synchronisation basierende zeitliche Einordnung wegen der in diesen Experimenten vorliegenden Stadiengemische nicht mit Sicherheit möglich war.

4.2.3.1 ConA-AlexaTM 488-Färbung

In Abb. 4.7 sind typische, mit ConA-AlexaTM 488 gefärbte Erkennungsstadien gezeigt. Erkennungsreaktionen wurden an morphologisch unterschiedlichen Stadien beobachtet. Während der Rot-Grün-Synchronisation traten Erkennungsstadien an sehr frühen Primordien auf, deren Zellen in Form und Größe denen von Hormogonien glichen (Abb. 4.7, Bild 4 und 5; Abb. 4.11). Diese Stadien produzierten aber im Gegensatz zu beweglichen Hormogonien bereits das durch ConA-AlexaTM 488 anfärbbare Mannose-haltige Glykokonjugat in ihrem Oberflächenschleim.

Bei Langzeitbeobachtungen wurden Inkorporationsstadien auch an späteren *Nostoc*-Primordien beobachtet. Diese Filamente hatten größere abgerundete Zellen (Abb. 4.7, Bild 1) mit einer dickeren Schleimschicht. Es wurden auch Erkennungsreaktionen an Filamenten beobachtet, deren Zellen innerhalb der wohl etwas festeren Schleimhülle bereits zur "Zickzack-Form" verschoben waren (Abb. 4.7, Bild 10 und 11). Bei diesen Experimenten lag keine synchrone Entwicklung der *Nostoc*-Filamente vor. Die Differenzierung von Hormogonien ist hier trotz Grünlichtbeleuchtung bereits durch den von Herdman und Rippka (1988) beschriebenen Effekt des frischen Mediums ausgelöst worden (siehe Kap. 3.1.3). Durch die 2 Tage später erfolgte Rotlichtbeleuchtung bildeten sich dann erneut Hormogonien. Daraus entstand ein Gemisch verschiedener Stadien, deren ungefähres Alter anhand ihrer Morphologie und den beiden "Signalen" zur Hormogonienbildung nur grob abgeschätzt werden konnte.

Sowohl die frühen als auch die späten vom Pilz erkannten *Nostoc*-Primordien hatten bereits die durch das fluoreszenzmarkierte Lektin ConA anfärbbare äußere Glykokonjugatschicht ausgebildet. In Abb. 4.7 Bild 6 und Abb. 4.9 Bild 3 und 4 ist zu erkennen, dass die angefärbte Schleimschicht der Cyanobakterien nicht vom Pilz mit eingeschlossen sondern nach außen gedrängt wurde. Erkennungsreaktionen fanden in Gegenwart des Lektins (Zugabe mit Beginn

der Grünlichtphase) genau so statt wie bei den ungefärbten lichtmikroskopisch beobachteten Ansätzen. Es konnte somit kein hemmender Einfluss des spezifisch an Methyl- α -D-Mannopyranosid- (mit geringem Anteil auch an Methyl- α -D-Glucopyranosid-) Reste bindenden Lektins ConA auf den Vorgang der Erkennung festgestellt werden (vgl. Kap. 4.1).

Bei den älteren Primordien-Stadien schien sich die Pilzhyphe zunächst durch die schon kräftig ausgebildete Schleimhülle hindurch zwischen einzelne Zellen zu zwängen, wobei die *Nostoc*-Zellen innerhalb der Hülle häufig verschoben und einzelne Zellen hinausgedrängt wurden (Abb. 4.7, Bild 11 und 12).

Der "Angriff" der Pilzhyphe erfolgte dann genau wie bei den jüngeren Primordien immer an der Berührungsstelle zweier benachbarter *Nostoc*-Zellen (Abb. 4.7, Bild 1 bis 3). Das Umschließen der *Nostoc*-Zellen durch den Pilz führte zu einer starken Deformation der Zellen. Sie wirkten zusammengedrückt und wurden häufig langgezogen (Abb. 4.7, Bild 7 und 8). Zu Beginn der Inkorporation kam es meist zu einer vorübergehenden Abnahme der Pigmentfluoreszenz (Abb. 4.7, Bild 10; Abb. 4.13) Es kam auch vor, dass einzelne Zellen eines Filamentes den mit der Deformation verbundenen Stress der Inkorporation nicht überlebten (Abb. 4.7, Bild 9).

Fortgeschrittenere Stadien der Inkorporation sind in Abb. 4.8 gezeigt. Zunächst wurden durch immer neue fingerförmig auswachsende Pilzstrukturen weitere *Nostoc*-Zellen des Filamentes eingeschlossen (Abb. 4.8, Bild 1 und 2). War die Aufnahme neuer Zellen in die Hyphe abgeschlossen, wurden die restlichen Zellen des Filamentes regelrecht vom Pilz abgeschnitten und die Hyphe begann anzuschwellen. Es entstand ein typisches "spindelförmiges" Zwischenstadium (Abb. 4.8, Bild 3 und 4), das durch weiteres Anschwellen der Hyphe zu einer jungen Blase heranwuchs (Abb. 4.8, Bildreihe 5 bis 9). In Abb. 4.8 Bildreihe 9 bis 12 sind nicht nur verschiedene Stadien einer Inkorporation gezeigt, es lassen sich an dem hier vorliegenden Stadiengemisch auch verschiedene Entwicklungsstadien der nicht an der Inkorporation beteiligten *Nostoc*-Filamente verfolgen. Der komplette Ablauf der Inkorporation ist in Kap. 4.2.4 in genauerer zeitlicher Auflösung dokumentiert und analysiert.

Zu Abb. 4.7: Frühe Erkennungsstadien im CLSM. Typische Formen des fortschreitenden Inkorporationsprozesses bei *Geosiphon pyriformis* sind gezeigt. Rot: Autofluoreszenz der Cyanobakterien-Pigmente, Grün: Fluoreszenz des ConA-AlexaTM 488. **1 bis 3:** Erkennung eines älteren *Nostoc*-Primordiums. Der zeitliche Abstand von Bild 1 zu Bild 2 beträgt fünf, von Bild 2 zu Bild 3 sechs Stunden. Der Pilz scheint sich zwischen Hüllmaterial und *Nostoc*-Zellen zu schieben. **4:** Potentielles Erkennungsstadium 11 Stunden nach Beginn der Grünlichtphase ähnlich dem in Abb. 4.6 mit schwarzem Pfeil gekennzeichneten Stadium. Die Erkennung erfolgt direkt unterhalb der Hyphenspitze, die an der Erkennungsstelle bereits leicht angeschwollen ist und den hier sehr stark markierten *Nostoc*-Schleim verdrängt hat. **5 und 6:** Erkennung eines unbeweglichen Hormogoniums nach 9 Stunden Grünlicht, 24 Stunden später sind 6 *Nostoc*-Zellen ganz und 3 halb inkorporiert. Der gefärbte *Nostoc*-Schleim bleibt außerhalb des Pilzes. **7 bis 9:** Inkorporation eines noch fadenförmigen Primordiums durch eine neu gebildete Seitenhyph. 27 Stunden nach Beginn der Grünlichtphase sind 2 Zellen von Pilzmaterial umschlossen, 14 Stunden später sind 3 Zellen ganz und die auf beiden Seiten folgenden Zellen halb eingeschlossen. Bei diesem Vorgang werden die Zellen zusammengedrückt und langgezogen (Pfeile). Nach 60 Stunden sind weitere Zellen inkorporiert, eine Zelle scheint den Vorgang nicht überlebt zu haben, da nur noch Reste der Fluoreszenz vorhanden sind (Pfeil). Die überlebenden Zellen beginnen sich zu regenerieren. **10:** Erkennung eines Primordium im "Zickzack"-Stadium mit ConA-markierter Hülle. **11 und 12:** Zu Beginn der Inkorporation bei älteren Primordien werden häufig *Nostoc*-Zellen aus der markierten Schleimhülle herausgedrängt (Pfeile).

Zu Abb. 4.8: Fortgeschrittene Inkorporationsstadien bei *Geosiphon pyriformis* im CLSM. Rot: Autofluoreszenz der Cyanobakterien-Pigmente, Grün: Fluoreszenz des ConA-AlexaTM 488. **1 und 2:** Typisches Inkorporationsstadium 19 und 35 Stunden nach Beginn der Grünlichtbeleuchtung. Zu beiden Seiten werden nacheinander weitere *Nostoc*-Zellen vom Pilz eingeschlossen. **3 und 4:** Nach Abschluss der Inkorporation neuer Zellen (hier nach 39 Stunden) erfolgt das Anschwellen der Pilzhyphe zur zukünftigen jungen Blase (56 Stunden). **5 bis 8:** Entwicklung eines Aufnahmestadiums nach 33 (Bild 5) und 39 (Bild 6) Stunden im Grünlicht zu einer jungen Blase (5 Tage, Bild 8). Hier wurde nach 56 Stunden (Bild 7) ein Teil der inkorporierten Zellen "aufgegeben", nur der Teil mit den zuerst aufgenommenen *Nostoc* entwickelte sich weiter. **9 bis 12:** Bildung einer jungen *Geosiphon*-Blase aus einem 3 Tage alten Inkorporationsstadium an einem fadenförmigen Filament. **9:** Insgesamt 8 Zellen sind inkorporiert, 4 davon sind stark deformiert und zeigen nur noch Reste fluoreszierender Pigmente. **10:** 4 *Nostoc*-Zellen haben die Inkorporation bis zum 4. Tag überlebt. Sie haben wieder eine runde Form angenommen und sind bereits größer als Zellen außerhalb des Pilzes. **11:** 2 Tage später sind bereits 8 *Nostoc*-Zellen in der größer gewordenen Blase zu erkennen. **12:** Nach erneuter Zugabe von fluoreszenzmarkiertem ConA am 7. Beobachtungstag ist nun auch die Wand der Blase markiert, die jetzt 13 symbiotische *Nostoc*-Zellen beherbergt. Verschiedene Stadien des Lebenszyklus von *Nostoc* können an dieser Bildreihe gut verglichen werden: Ältere Filamente, deren Entwicklung schon mit Beginn der 2-tägigen Vorinkubation begonnen hat und die bereits Zellteilungen durchlaufen haben, sind von einer stark markierten äußeren Hüllschicht umgeben. Jüngere Filamente zeigen dagegen nicht nur wegen der geringeren Farbstoffkonzentration im Medium keine oder nur eine schwache Markierung. Nach erneuter Farbstoffgabe (Bild 12) sind diese Filamente zwar deutlich markiert, haben aber erst eine vergleichsweise dünne Schleimschicht ausgebildet. An Filament a lässt sich die Entwicklung vom späten Primordium mit großen abgerundeten Zellen durch den Beginn erneuter Zellteilungsaktivität zu einem vegetativen Filament verfolgen. Zellen der Filamente b und c, die das vegetative Stadium bereits erreicht haben, entwickeln sich innerhalb eines Tages zu sekundären Hormogonien (d) und lassen leere Schleimhüllen zurück.

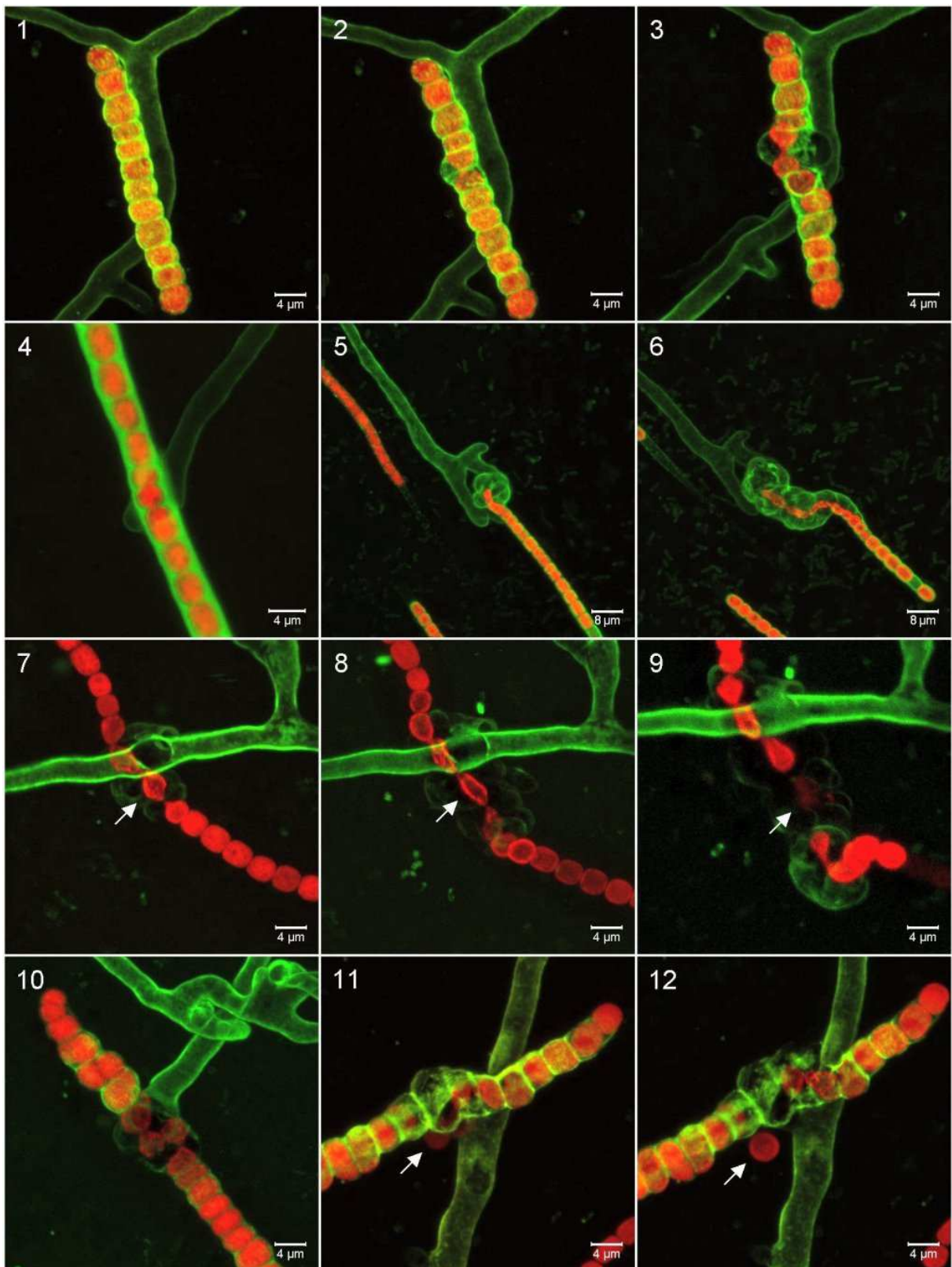


Abb. 4.7: Frühe Erkennungsstadien bei *Geosiphon pyriformis* im CLSM (Legende siehe Seite 61).

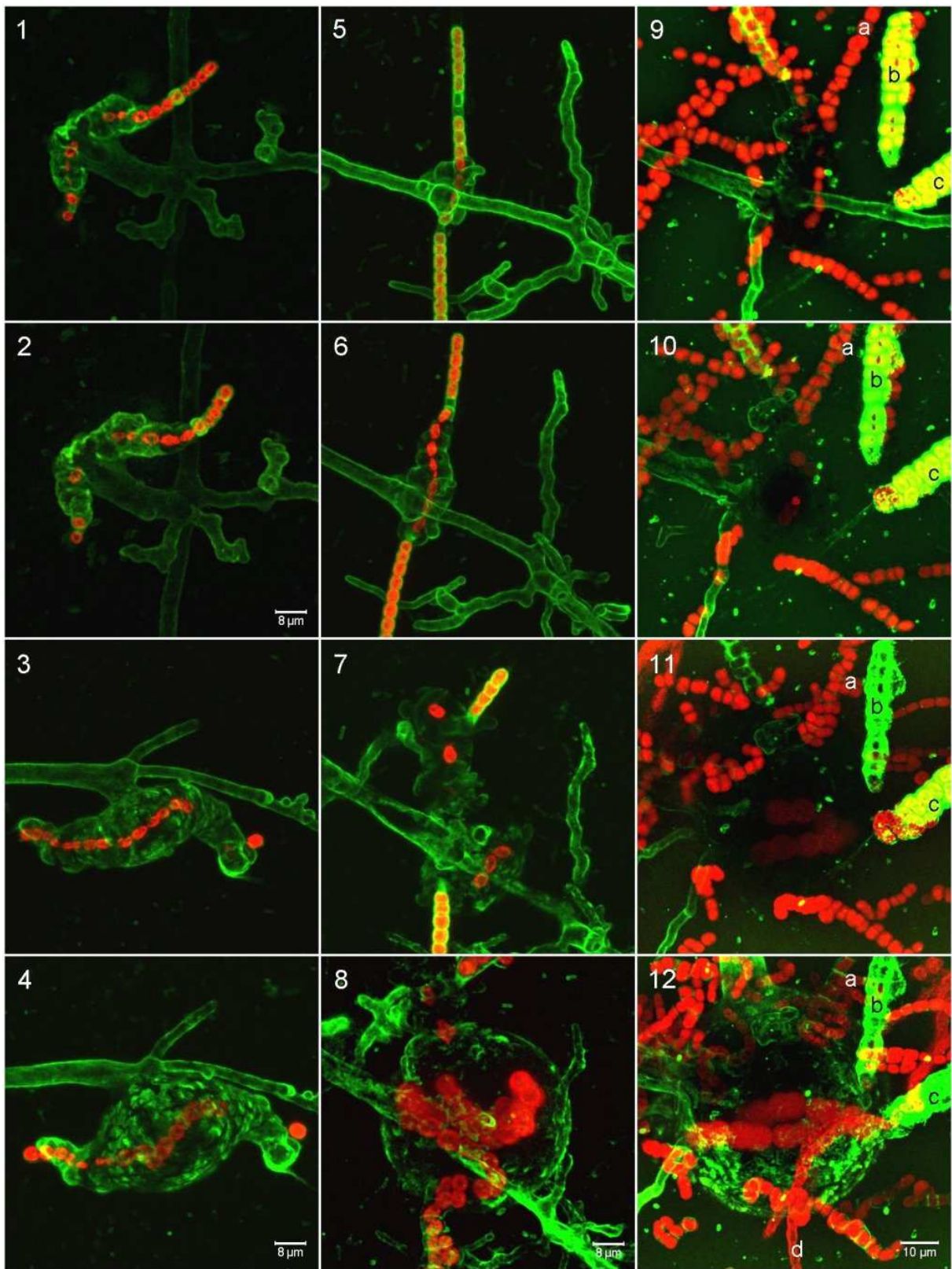


Abb. 4.8: Fortgeschrittene Inkorporationsstadien bei *Geosiphon pyriformis* im CLSM (Legende siehe Seite 61).

4.2.3.2 Mucin-Oregon Green[®] 488-Färbung

Da bei Sättigungsexperimenten (siehe Kap. 4.1) eine verminderte Anzahl von Erkennungsstadien in Mucin-haltigen Ansätzen bei Konzentrationen über 0,04% auftrat, wurde ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green[®] 488 gekoppeltes Mucin als Farbstoff (10µg/ml) zur CLSM-Beobachtung eingesetzt. Das Mucin-Oregon Green[®] 488 färbt sowohl die Pilzhypen als auch die Schleimhülle der Cyanobakterien. Dabei sind wie auch bei der ConA-Alexa[™] 488-Markierung Hormogonien nicht oder sehr schwach gefärbt, während ältere Primordien eine ebenso starke Markierung zeigen wie die Pilzhypen (Abb. 4.9). An den Hyphen wurden keine Markierungsunterschiede zwischen Hyphenspitzen, älteren Hyphenabschnitten oder Erkennungsstellen mit *Nostoc* festgestellt. Auch in Anwesenheit des hier sehr niedrig konzentrierten Mucins, das ebenfalls mit Beginn der Grünlichtphase zugegeben wurde, fanden wie in den Sättigungsexperimenten bei niedrigen Konzentrationen Erkennungsreaktionen und Inkorporationen bis zur Bildung von jungen *Geosiphon*-Blasen statt (Abb. 4.9). Auffällig war das relativ häufige Auftreten von angeschwollenen Hyphenspitzen, bei denen jedoch keine Inkorporation vorlag (Abb. 4.10).

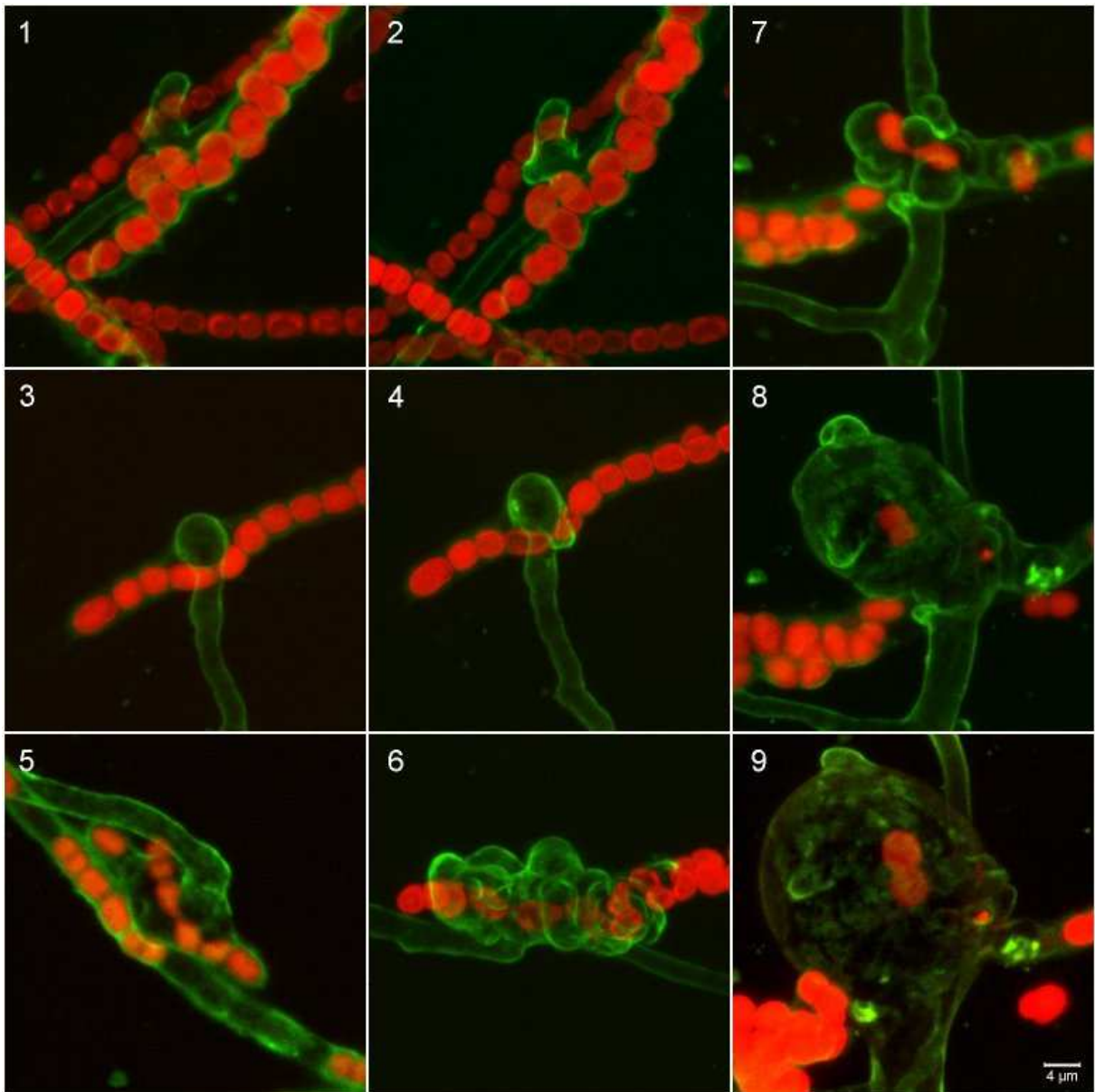


Abb. 4.9 Frühe Erkennungs- und Inkorporationsstadien in einem mit Mucin-Oregon Green® 488 angefärbten Ansatz. **1** und **2**: Reaktion des Pilzpartners nach 8 bzw. 10 Stunden Grünlichtbeleuchtung auf das noch nicht von Mucin markierte frühe Primordienstadium. Das ältere Filament, das während der 2-tägigen Vorinkubation in Grünlicht entstanden ist, ist etwa 3 Tage alt und hat eine deutliche, von Mucin markierte Schleimhülle ausgebildet. **3** und **4**: Frühes Erkennungsstadium, gescannt im Abstand von 6 Stunden. Die angeschwollene Pilzhyphe schiebt sich unter die nur schwach markierte Schleimschicht des Filamentes. **5** und **6**: Es finden sowohl Erkennungsreaktionen an fadenförmigen Filamenten als auch an *Nostoc* im "Zickzack"-Stadium statt. **7** bis **9**: Die Erkennung eines markierten fadenförmigen Filamentes nach 3,5 Tagen führt nach dem Anschwellen der Hyphe (4. Tag) zur Bildung einer jungen Blase am 5. Tag der Grünlichtbeleuchtung.

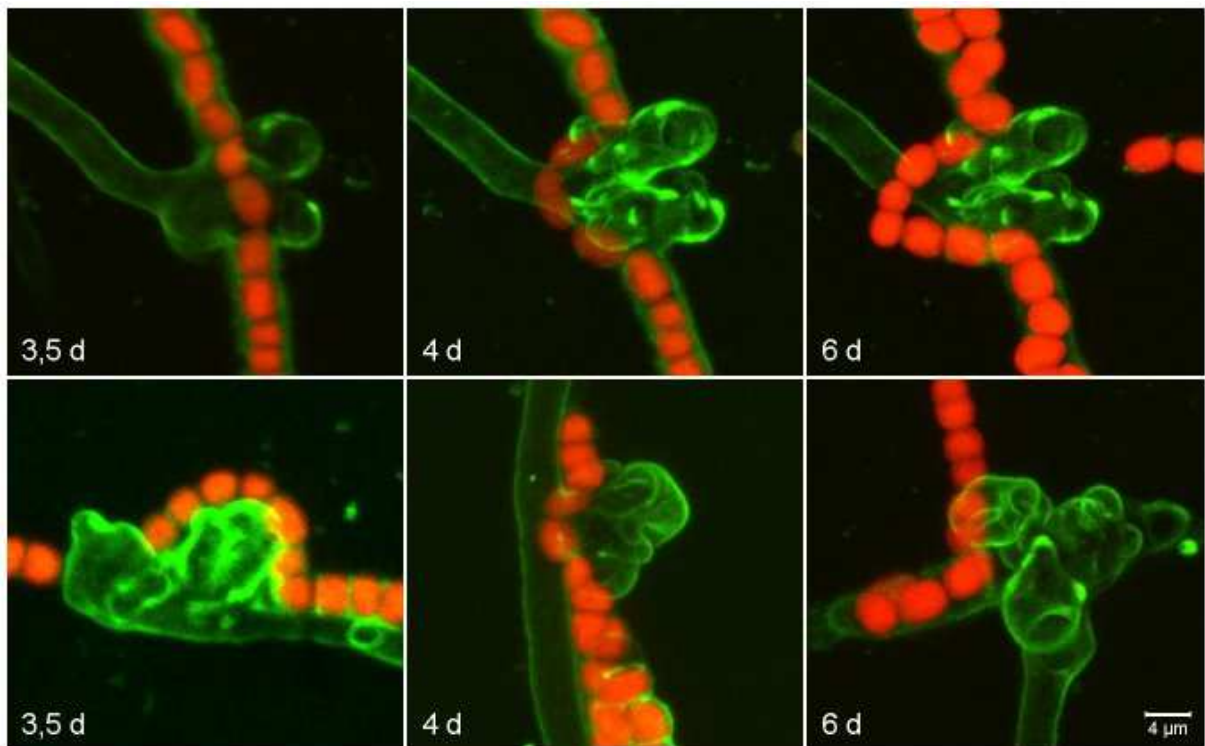


Abb. 4.10: Angeschwollene Hyphenspitzen ähnlich wie bei einer Erkennungsreaktion im Mucin-Oregon Green[®] 488-markierten Ansatz bei der Begegnung mit *Nostoc*-Filamenten. Die oberen 3 Bilder einer Zeitreihe zeigen, dass keine Inkorporation von *Nostoc*-Zellen stattfindet.

4.2.4 Der Inkorporationsprozess

Über einen Zeitraum von 5 Tagen wurde die vollständige Entwicklung junger *Geosiphon*-Blasen am CLSM dokumentiert (Abb. 4.11). Dazu wurden *Geosiphon*-Blasen wie in Kap. 2.2.2 beschrieben präpariert und zusammen mit *Nostoc* des Stammes 1:1-26 in einer Filterkammer kultiviert. Das zur Erkennung durch den Pilz bereite *Nostoc*-Stadium wurde durch Synchronisation des *Nostoc*-Lebenszyklus induziert. Zum Anfärben der Pilzhyphe und der Mannose-haltigen *Nostoc*-Hülle wurde dem *Geosiphon*-Medium das mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markierte Lektin ConA (ConA-FITC) in einer Konzentration von 7 µg/ml Medium zugesetzt.

Nach 9 Stunden im Grünlicht befanden sich bei dem in Abb. 4.11 gezeigten frühen Aufnahmestadium bereits 5 Zellen im Inneren der Pilzhyphe. Je eine weitere Zelle zu beiden Seiten der pilzlichen Inkorporationsstruktur war ebenfalls schon zur Hälfte von Pilzmaterial umgeben. Das *Nostoc*-Filament war zu diesem Zeitpunkt, wie auch bei den Lektin-Markierungsstudien (Kap. 3.2) und den oben gezeigten frühen Erkennungsstadien beobachtet, vollständig mit ConA markiert. Die eingeschlossenen *Nostoc*-Zellen zeigten keine ConA-FITC Fluoreszenz. Nachdem die ersten 5 Zellen in sehr kurzer Zeit eingeschlossen wurden (innerhalb von 5 bis 7 Stunden, wenn das *Nostoc*-Filament schon sehr früh nach Beginn der Grünlichtphase unbeweglich wurde), wurden im folgenden Zeitraum von 9 bis 16,5 Stunden im Grünlicht keine weiteren Zellen inkorporiert. Allerdings waren die Zellen nach 16,5 Stunden z.T. etwas stärker verformt als zu Beginn des Prozesses. In den folgenden Stunden wurde dann die Aufnahme weiterer *Nostoc*-Zellen fortgesetzt, bis nach 33 Stunden 13 Zellen vom Pilz umschlossen zu sein schienen. 6 Stunden später war das *Nostoc*-Filament geteilt, 12 Zellen befanden sich innerhalb des Pilzes, die 13. Zelle blieb mit dem Rest des Filamentes außerhalb.

Auch die Form und die Größe der Zellen wurden durch den Prozess der Inkorporation beeinflusst. Nach 9 Stunden hatten die teils zylinder-, teils kugelförmigen Zellen des frühen Primordiums eine Größe von 2,3 bis 3,4 µm in der Länge und etwa 2,5 µm in der Breite (gemessen am Fluoreszenzsignal) und entsprechen damit denen der Hormogonien. Nach 33 Stunden waren die Zellen innerhalb des Pilzes mit ca. 4,8 µm bereits etwa doppelt so lang wie Hormogonien-Zellen und unterschieden sich damit deutlich von den außerhalb liegenden Zellen. Diese hatten ihre eher kugelige Form behalten und zeigten mit ca. 3,2 µm eine geringe Größenzunahme in der Breite. Das Größenwachstum der Zellen setzte sich außerhalb und innerhalb des Pilzes bis über 61 Stunden (2,5 Tage) fort, ohne dass es zu Zellteilungen kam. Nach 5 Tagen hatten die nun endosymbiotisch innerhalb des Pilzes lebenden Zellen im Mittel eine Länge von 6,3 µm und eine Breite von 5,7 µm erreicht, während die außerhalb des Pilzes verbliebenen Zellen in der Länge um 4,2 µm und in der Breite um 3,3 µm variieren. Daraus

ergibt sich nach $V = \pi d^2 l / 6$ zur Berechnung des Volumens elliptischer Rotationskörper (d: Durchmesser, l: Länge) für die Zellen innerhalb der Blase das 4-5-fache Volumen freilebender *Nostoc*-Zellen.

Die Intensität des Fluoreszenzsignals der aufgenommenen *Nostoc*-Zellen nahm während des Inkorporationsprozesses zunächst ab. In Abb. 4.13 sind Zellen innerhalb und außerhalb des Pilzes in einzelnen optischen Schnitten gezeigt, d.h. mit gleicher Entfernung zum Objektiv und somit gleichen optischen Bedingungen. Nach 33 Stunden waren die Zellen innerhalb des Pilzes zwar deformiert, fluoreszierten aber etwa gleich stark wie die außerhalb liegenden Zellen. Nach 56 Stunden war das Fluoreszenzsignal von *Nostoc* innerhalb des Pilzes sehr viel schwächer als das der freilebenden Zellen. Nach 5 Tagen zeigten die in der Symbiose etablierten Zellen wieder ein stärkeres Signal.

Zwischen 2,5 und 5 Tagen teilten sich sowohl die 10 Zellen des freilebenden Filamentes als auch die 10 Zellen im Innern des Pilzes, die den Inkorporationsvorgang überlebt hatten. In Abb. 4.12 ist zur Darstellung der jeweiligen Anzahl der *Nostoc*-Zellen nur die Autofluoreszenz der Cyanobakterien projiziert. Die genaue Anzahl der *Nostoc*-Zellen lässt sich jedoch an den Projektionen der Bildstapel nicht ermitteln, da die weiter vom Objektiv entfernten Zellen wegen ihres schwächeren Fluoreszenzsignals kaum zu erkennen sind und von den näher zum Objektiv gelegenen Zellen verdeckt werden. Wie in Abb. 4.14 gezeigt ist, kann die genaue Zellzahl durch die Verwendung der confokalen Optik anhand der einzelnen optischen Schnitte bestimmt werden (siehe Kap. 2.5). In der 5 Tage alten *Geosiphon*-Blase war die Zahl der symbiotisch lebenden *Nostoc*-Zellen bereits auf 111 (in vierter Teilung) angewachsen (siehe Abb. 4.12), während das Filament außerhalb des Pilzes erst 17 Zellen (in erster Teilung) enthielt, von denen sich 3 im Teilungsprozess befanden. Das bedeutet, dass die Zellteilungsrate der symbiotischen Zellen innerhalb der Blase etwa 3- bis 4-mal so hoch war wie die der freilebenden Zellen. Diese Steigerung der Zellteilungsrate wurde bei mehreren Inkorporationen beobachtet.

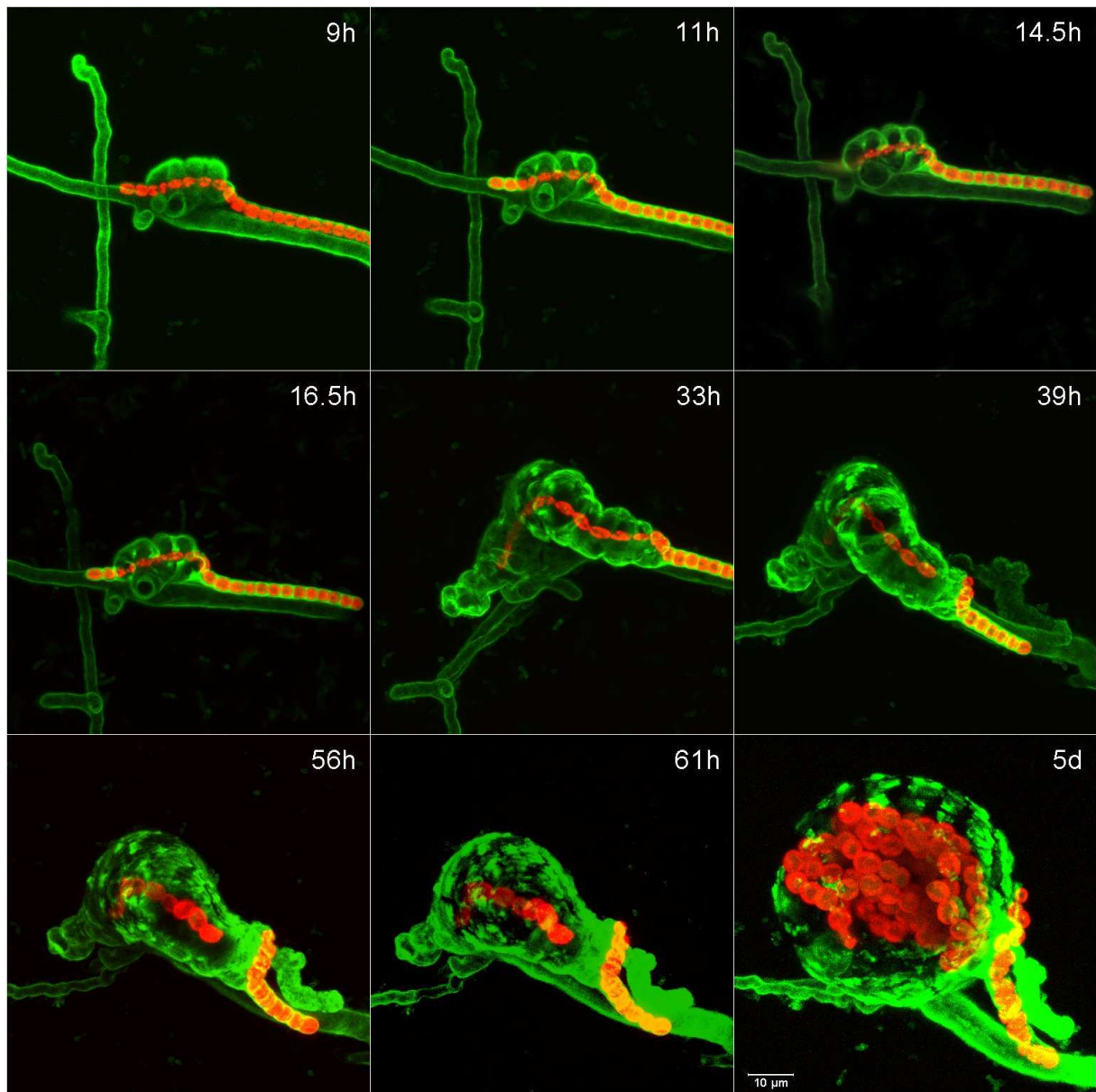


Abb. 4.11: Kompletter Inkorporationsprozess von einem frühen Erkennungsstadium bis hin zur vollständig entwickelten jungen *Geosiphon*-Blase. Die einzelnen Bilder sind Maximumprojektionen von 15 (9h) bis zu 64 (5d) einzelnen optischen Schnitten im Abstand von 0,8 bis 1µm. Um die durch verschiedene Laserleistung und PMT-Einstellungen unterschiedliche Fluoreszenzintensität zwischen den einzelnen Bildern etwas anzugleichen, wurden Kontrast und Helligkeit der Bilder nachbearbeitet. Folgende CLSM-Einstellungen wurden verwendet: Objektiv 63x, Bildgröße 512x512 Pixel, Pinhole 1,82 airy, Scan Geschwindigkeit: medium, Zoom 2, keine Mittelung, Laser-Leistung ca. "9 Uhr", AOTF 488 nm und 568 nm jeweils 25%, Detektion: PMT 1: 500-560 nm, PMT 2: 580-735 nm.

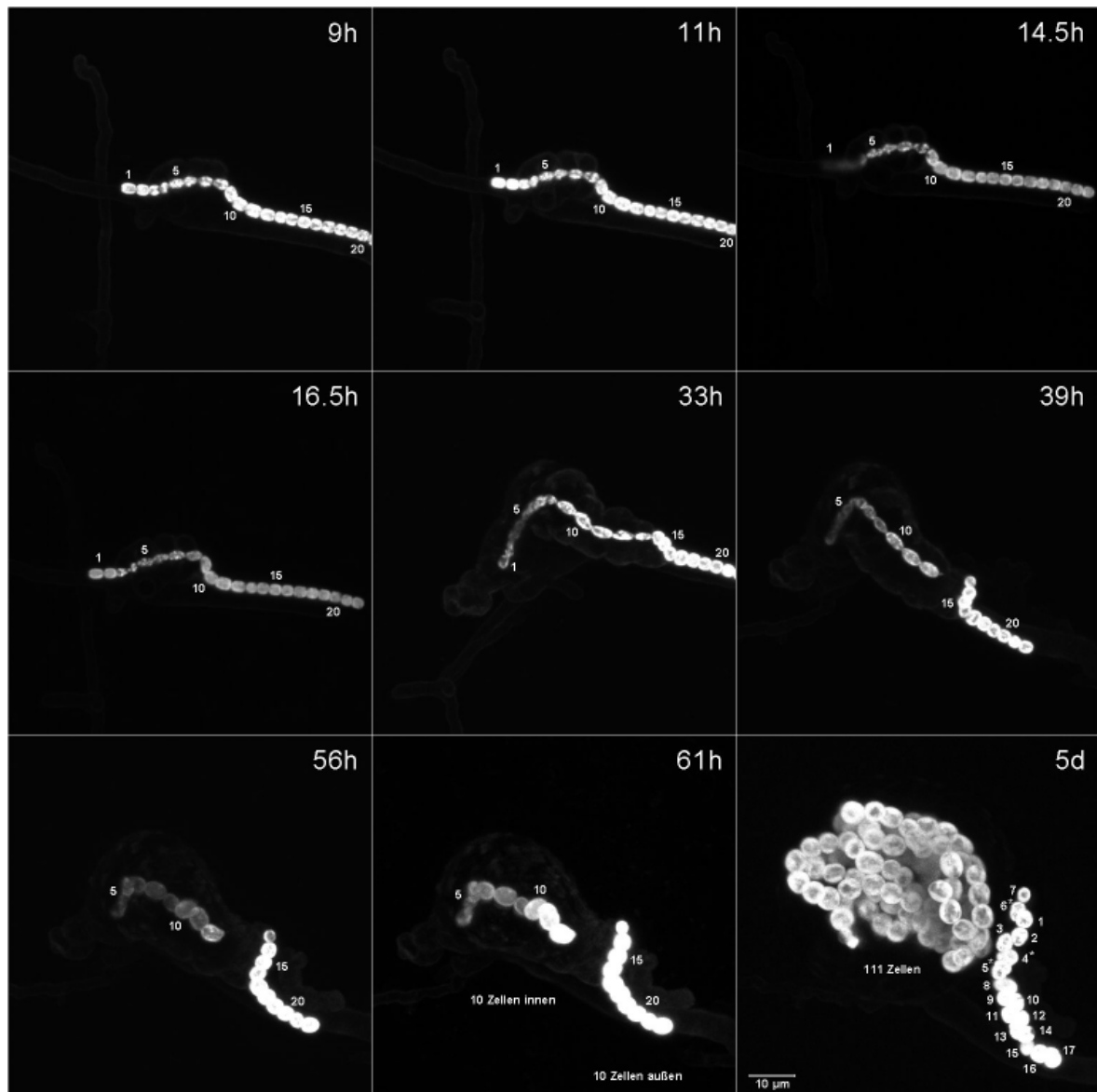


Abb. 4.12: Anzahl der *Nostoc*-Zellen innerhalb und außerhalb des Pilzes während der Inkorporation. Dargestellt sind Projektionen des Autofluoreszenz-Signals der Cyanobakterien-Pigmente im Bereich von 600 nm bis 735 nm. Die genaue Zellzahl wurde anhand der einzelnen optischen Schnitte (siehe Abb. 4.14) analysiert.

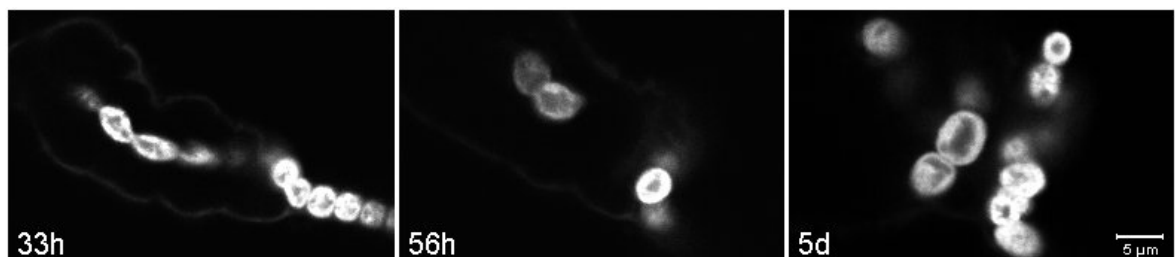


Abb. 4.13: An einzelnen optischen Schnitten ist zu erkennen, dass nach 33 Stunden *Nostoc*-Zellen innerhalb und außerhalb des Pilzes etwa gleich stark fluoreszieren, während nach 56 Stunden ein deutlicher Unterschied in der Fluoreszenzintensität besteht. Der Photomultiplier wurde so eingestellt, dass im Innern der Blase die Zellen mit schwächerem Signal dargestellt werden konnten. Die Fluoreszenz der außerhalb der Blase liegenden Zellen liegt oberhalb des Dynamikbereiches des Photomultipliers, so dass kein quantitativer Intensitätsvergleich möglich ist.

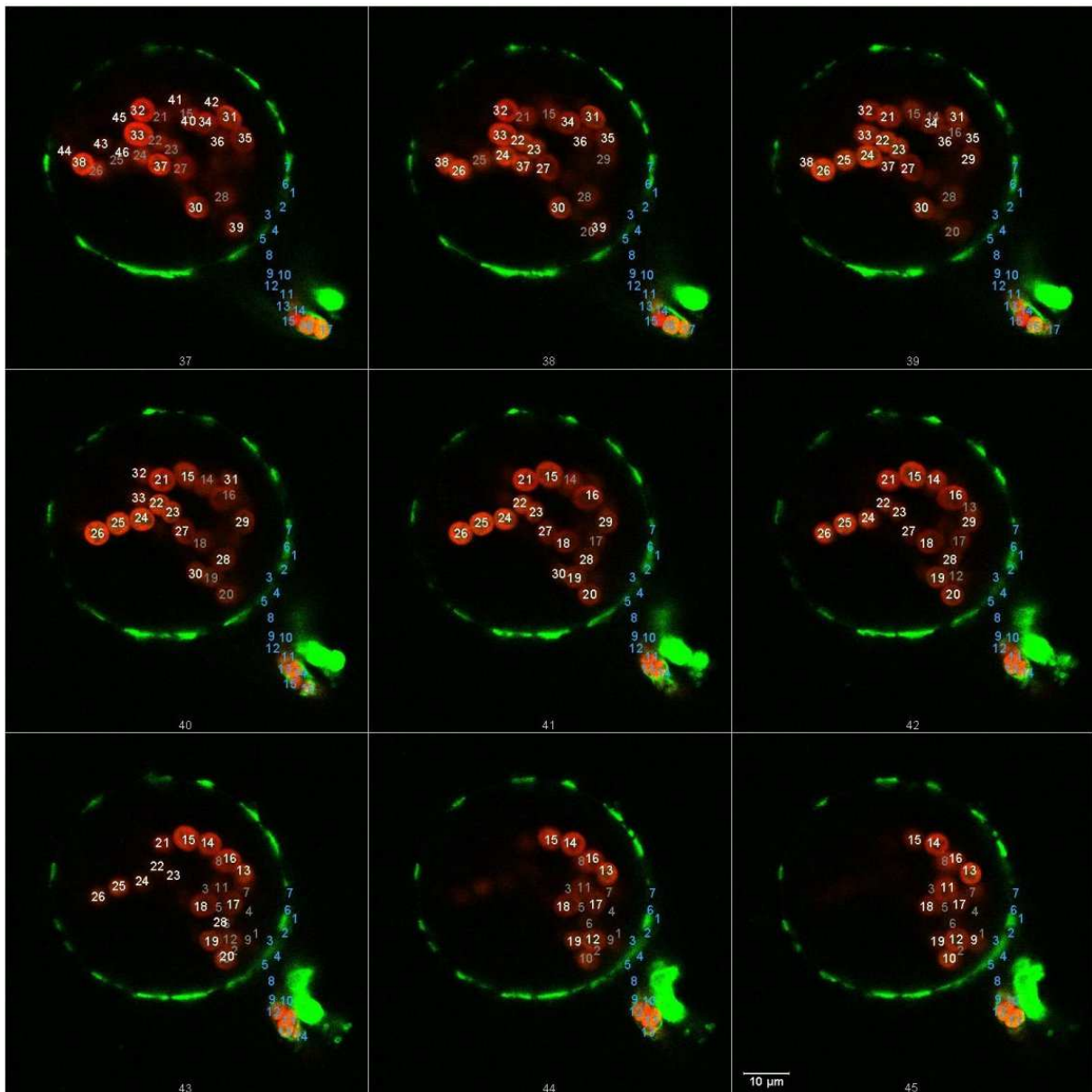


Abb. 4.14: Durch Vergleich der einzelnen optischen Schnitte der 5 Tage alten *Geosiphon*-Blase kann die Anzahl der *Nostoc*-Zellen in der Blase bestimmt werden. Gezeigt sind die Schnitte 37 bis 45 von 64 optischen Schnitten mit einem Abstand in z-Richtung von $0,93 \mu\text{m}$. Die Zellen innerhalb der Blase sind mit weißen Ziffern nummeriert, graue Ziffern kennzeichnen die Position von Zellen aus vorherigen Ebenen. Zellen außerhalb der Blase sind blau markiert.

4.2.5 Diskussion

4.2.5.1 Methodik

Geosiphon ist im Gegensatz zu vielen anderen symbiotischen Systemen sehr gut für mikroskopische Entwicklungsstudien am lebenden Organismus zugänglich. Mit der hier vorgestellten Methode konnten vereinzelte *Geosiphon*-Blasen in flüssigem, nährstoffarmem Medium bis zu mehreren Wochen kultiviert und mikroskopisch beobachtet werden. Der Vorgang der Inkorporation wurde bereits von Knapp (1933) mikroskopisch dokumentiert und in einer Studie von Mollenhauer et al. (1996) beschrieben. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Experimente zeigen, dass mit Hilfe der Synchronisation des *Nostoc*-Lebenszyklus eine gezielte Induktion des zur Erkennung fähigen *Nostoc*-Stadiums erreicht werden konnte. In Gegenwart wachsender *Geosiphon*-Hyphen konnte so die Bildung von Erkennungsstadien und die Etablierung der Symbiose gezielt ausgelöst werden. Damit stand eine Methode zur Verfügung, mit der der Vorgang der Erkennung und der Prozess der Inkorporation von *Nostoc*-Zellen in die Pilzhyphe genauer als bisher untersucht werden kann. Mollenhauer et al. (1996) beschrieben bereits, dass nur *Nostoc*-Filamente im Primordien-Stadium des Lebenszyklus vom Pilz inkorporiert werden. Dieser Begriff umfasst allerdings alle Übergangsstadien zwischen beweglichen Hormogonien und den teilungsaktiven, von einer dicken Polysaccharidmatrix umgebenen vegetativen Filamenten. Mit der Methode der Rot-Grün-Beleuchtung ließen sich diese Stadien im Lebenszyklus von *Nostoc* synchronisieren und genauer charakterisieren. In Gegenwart vereinzelter, auskeimender *Geosiphon*-Blasen konnte dann beobachtet werden, welche Stadien vom Pilz erkannt werden. Auch der auf die Erkennung folgende Vorgang der Inkorporation konnte mikroskopisch verfolgt und dokumentiert werden. Die zur Synchronisation erforderliche Dauerbeleuchtung hatte dabei keinen negativen Einfluss auf das Wachstum von *Geosiphon*. Während der 1,5 Tage dauernden Rotlichtphase keimten aus den vereinzelter Blasen neue Hyphen aus, an denen später die Bildung von Aufnahmestadien beobachtet werden konnte. Um die Anzahl wachsender Hyphen und damit die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von Inkorporationsstadien zu erhöhen, wurde bei einigen Experimenten eine 2-tägige Grünlichtphase vorgeschaltet. Dies führte aber, wie in Kap. 3.1.2 beschrieben, zur Bildung eines Stadiengemisches, da der die Hormogonienbildung hemmende Effekt der Grünlichtbeleuchtung von der fördernden Wirkung des frischen Mediums (Herdman und Rippka, 1988) überlagert wurde. Wenn vitale *Geosiphon*-Blasen (siehe Kap. 4.1.4) aus der Erdkultur zur Verfügung standen, wurden aber auch ohne diese Vorlaufphase genügend neue Hyphen gebildet, an denen Inkorporationen stattfanden.

Die Methode der Beobachtung der lebenden Organismen im Lichtmikroskop und am CLSM ist sehr gut zur Verfolgung von Entwicklungsprozessen geeignet. Mollenhauer et al. (1996) konnten die Entwicklung der *Nostoc*-Zellen in sehr frühen Inkorporationsstadien im Lichtmikroskop nur schlecht verfolgen, da das "schaumige Cytoplasma" des Pilzes kein klares Bild ermöglicht. Die fluoreszenzmikroskopische Beobachtung im CLSM bietet dagegen den Vorteil, dass auch *Nostoc*-Zellen direkt nach der Inkorporation erkennbar sind. Allerdings musste bei der CLSM-Beobachtung die Strahlungsintensität des Anregungslasers auf ein Minimum reduziert werden, da sonst Strahlungsschäden auftraten, die zum Absterben der empfindlichen frühen Inkorporationsstadien führten. Bei der Beobachtung lebender Organismen mit dem CLSM müssen daher, um die jeweils noch tolerierte Strahlungsmenge nicht zu überschreiten, gegebenenfalls Abstriche beim Signal/Rausch-Verhältnis in Kauf genommen werden. Bei der Dokumentation des Inkorporationsprozesses von *Geosiphon* konnte mit den hier verwendeten Lasereinstellungen und Scanoptionen dennoch eine sehr gute Bildqualität erreicht werden. Inkorporationen, die bis zur Bildung der jungen Blase überlebten, wurden mit dem 63er Objektiv bei Zoom 4, mit mittlerer Scan-Geschwindigkeit, einer Auflösung von 512 x 512 Pixel, niedriger Laser-Leistung (Power ca. "10 Uhr", AOTF 488 nm 45 % oder AOTF 488 nm und 568 nm mit je 25%), höchstens 2 Mittelungen pro Ebene und mit Zeitabständen von mehreren Stunden zwischen den Aufnahmen durchgeführt. Eine Erhöhung der Auflösung von 512 x 512 auf 1024 x 1024 Pixel oder zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses durchgeführte mehrfache Mittelungen bedeuten jeweils mindestens eine Verdoppelung der Einstrahlungszeit des Lasers und führten meist ebenso wie zu kurze Zeitabstände zwischen mehreren Scans zum Absterben der Stadien. Möglicherweise spielen jedoch noch weitere Faktoren der Versuchsbedingungen eine Rolle.

4.2.5.2 Das Symbiose-kompetente *Nostoc*-Stadium

Die ersten morphologisch erkennbaren Inkorporationsstadien an wachsenden Hyphenspitzen wurden nach 8 bis 9 Stunden Grünlichtbeleuchtung sowohl im Lichtmikroskop als auch im CLSM beobachtet. An den hier schon deutlich entwickelten morphologischen Strukturen ist zu sehen, dass die eigentliche Erkennung zwischen den beiden Organismen bereits zu einem früheren Zeitpunkt stattgefunden haben muss. Da die *Nostoc*-Filamente unbeweglich sein müssen, um eine Erkennungsreaktion zu ermöglichen, konnte der Beginn der Phase im Lebenszyklus von *Nostoc punctiforme*, in der die Filamente vom Pilzpartner erkannt werden können, auf den Zeitbereich zwischen 4 und 8 Stunden nach Beginn der Grünlichtphase eingegrenzt werden. Das entspricht genau dem Entwicklungsstadium im Lebenszyklus der Cyanobakterien, in dem die Filamente ihre Bewegungsfähigkeit verloren (siehe Kap. 3.1.2) und in der sie die chemische Zusammensetzung ihres Oberflächenschleims veränderten (siehe Kap. 3.2; Schüßler et al., 1997). CLSM-Bilder dieser frühen Erkennungsstadien zeigten

bereits eine deutliche Markierung der vom Pilz erkannten Filamente mit dem fluoreszenzmarkierten Lektin ConA.

Die Erkennungsreaktion war aber nicht auf das Stadium der gerade unbeweglich gewordenen Hormogonien oder sehr frühen Primordien beschränkt. Bei Langzeitbeobachtungen an Stadiengemischen traten auch frühe Inkorporationsstadien an älteren Primordien auf. Ihre Zellen waren bereits deutlich größer als die der Hormogonien und z.T. schon innerhalb der fester werdenden Glykokonjugathülle zur Zickzack-Anordnung verschoben. Es hatten aber noch keine Zellteilungen stattgefunden. Bei keinem der durchgeführten Experimente wurden - auch nicht an Hyphen, die direkt in einen der zugegebenen *Nostoc*-Thalli hineingewachsen waren - Erkennungsstadien an vegetativen Filamenten beobachtet. Eine Erkennung kann also ab dem Ende der Hormogonienphase bis zum Beginn der typischen Zickzack-Verschiebung stattfinden. Ob die Erkennungsreaktionen an den älteren Primordien, bei denen der Pilz mehr Mühe zu haben schien, unter der dickeren Glykokonjugatschicht zu den *Nostoc*-Zellen vorzudringen, dennoch genauso häufig erfolgreich zur Bildung junger Blasen führen wie bei den häufiger beobachteten frühen Primordien, kann noch nicht sicher gesagt werden. Während der hier gezeigten Beobachtungen wurden Erkennungsreaktionen an solchen älteren Primordien häufig unvollendet abgebrochen. Dies könnte aber auch mit zu großen Belastungen durch das Scannen der Proben zusammenhängen.

4.2.5.3 Fluoreszenzmarkierung

Die beiden verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe markieren sowohl die Pilzzellwand als auch den Schleim der *Nostoc*-Primordien, während Hormogonien keine Markierung zeigen. Bei Aufnahmestadien war jedoch keine Fluoreszenz zwischen der Pilzzellwand und der *Nostoc*-Oberfläche erkennbar. Möglicherweise wird die markierte Polysaccharidschicht der Cyanobakterien durch den Pilz teilweise zersetzt. CLSM-Bilder zeigten allerdings, dass sich der Pilz bei der Inkorporation zwischen die markierte Hüllschicht und die *Nostoc*-Zellen schiebt (Abb. 4.6 Bild 6, Abb. 4.9 Bilder 3 und 4). Sowohl die Markierung mit ConA als auch die mit Mucin zeigte, dass die fluoreszenzmarkierte Hülle der vom Pilz erkannten Filamente nicht zusammen mit den *Nostoc*-Zellen inkorporiert wird. Die schon weiter entwickelte äußere Hülle der Zickzack-Stadien schien ein größeres Hindernis für den Pilzpartner darzustellen als die dünnere Glykokonjugatschicht der frühen Primordien. Das Eindringen des Pilzes zwischen *Nostoc*-Zellen und Schleimhülle führte häufig zu einer Verschiebung der Zellen innerhalb der Hülle. Bei älteren Stadien konnten dadurch einzelne Zellen aus der markierten Hülle herausgedrängt werden.

Weder die Färbung mit ConA noch die mit Mucin (beide Stoffe binden sowohl an den Primordien-Schleim als auch an die Oberfläche der Pilzzellwand) ergab einen Hinweis auf den Mechanismus der Erkennung. An den Hyphen selbst wurden keine Unterschiede in der

Markierung durch ConA oder Mucin beobachtet, wie etwa eine besonders starke oder eine fehlende Markierung in Hyphenbereichen, die potentiell für eine Erkennung in Frage kommen. Die Erkennung findet an wachsenden Hyphenspitzen statt, deren Zellwand noch nicht komplett ausgebildet ist. Das Zellwandmaterial, das auch bei den neu gebildeten fingerförmigen Ausstülpungen des Pilzes während der Inkorporation schon vorhanden ist (Mollenhauer et al., 1996), zeigte ebenso wie die älteren Hyphen eine Markierung. Im Gegensatz zu den Pilzhypen waren die *Geosiphon*-Blasen auch nach erneuter Farbstoffzugabe nur unregelmäßig markiert.

Auffällig war in den mit Mucin Oregon Green[®] 488 markierten Ansätzen das Auftreten von angeschwollenen Pilzhypen an Berührungsstellen mit potentiell zur Erkennung fähigen *Nostoc*-Filamenten, ohne dass es tatsächlich zu einer Inkorporation von *Nostoc*-Zellen kam. Stattdessen schien der Pilz die *Nostoc*-Zellen aus ihrer markierten Hülle herauszuschieben. Ähnliche Beobachtungen wurden bei Sättigungsexperimenten mit Mucin gemacht, bei denen ebenfalls angeschwollene oder verdickte Hyphenenden auftraten (siehe Kap. 4.1.3). Allerdings wurden diese Beobachtungen bei sehr viel höheren Mucin-Konzentrationen und an Hyphenbereichen ohne erkennbaren Kontakt zu *Nostoc*-Filamenten gemacht. Auch wenn solche Stadien in den Mucin-Ansätzen auffielen, traten sie im Vergleich zu erfolgreichen Inkorporationen seltener auf. Warum bei den hier beobachteten Stadien die *Nostoc*-Zellen regelrecht weggeschoben und aus ihrer Schleimhülle herausgedrängt anstatt inkorporiert wurden, ist nicht klar.

4.2.5.4 Der Inkorporationsprozess

Der in Abb. 4.11 dargestellte Ablauf des Inkorporationsprozesses bei Beobachtungen am CLSM zeigt die typischen Entwicklungsstadien der Bildung einer jungen Blase, wie sie auch bei allen anderen beobachteten Inkorporationen in sehr ähnlicher Form auftraten. Dieser Ablauf wurde prinzipiell bereits von Knapp (1933) und Mollenhauer et al. (1996) mit klassischer lichtmikroskopischer Technik beobachtet, allerdings ohne eine genaue zeitliche Zuordnung der Inkorporationsstadien. Die in der vorliegenden Arbeit dokumentierten Entwicklungsstadien können in ihrem zeitlichen Ablauf etwas variieren, da unterschiedlich viele Zellen pro Zeit inkorporiert werden können und durchaus auch lange Pausen zwischen "Inkorporationsschüben" entstehen. Zu Beginn einer Inkorporation wurde bei noch hormogonienähnlichen frühen Primordien-Stadien häufig eine Aufnahme mehrerer Zellen innerhalb weniger Stunden beobachtet. Danach kann, wie im gezeigten Beispiel, über 16 Stunden lang keine sichtbare Veränderung erfolgen, bevor die Inkorporation fortgesetzt wird. Bei fortgeschritteneren Erkennungsstadien wurde allerdings meist ein Zeitbedarf von etwa 7 Stunden zur vollständigen Inkorporation einer weiteren *Nostoc*-Zelle festgestellt. Gegen Ende der Inkorporationsphase, die etwa 1,5 bis 2 Tage dauert, läuft der Prozess dann

nochmals deutlich langsamer ab. Die Anzahl der schließlich inkorporierten Zellen ist unterschiedlich, sie lag bei diesen Beobachtungen zwischen 2 und 12 Zellen. Zum Abschluss der Inkorporationsphase schneidet der Pilz die übrigen Zellen des Filamentes ab, und die unregelmäßig geformte Hyphe beginnt anzuschwellen. Dadurch entsteht zunächst ein typisches spindelförmiges Stadium, das sich durch weiteres Anschwellen in den folgenden 2,5 bis 3,5 Tagen zu einer kugelförmigen jungen Blase entwickelt.

4.2.5.5 Auswirkungen der Inkorporation auf *Nostoc*

Bei der Inkorporation wurden an den aufgenommenen Cyanobakterien häufig Deformationen beobachtet. Schon mit Beginn des "Pilzangriffs" werden die beiden Zellen, zwischen denen die Inkorporation beginnt, auseinandergedrückt, aber nicht getrennt. Sobald die Zellen komplett von Pilzplasma umgeben sind, werden sie z.T. stark verformt. Dabei scheinen auch die Thylakoidmembranen mit den fluoreszierenden Photosynthesepigmenten in Mitleidenenschaft gezogen zu werden, da in diesem Stadium häufig nicht mehr die ganze Zelle fluoreszierte, sondern nur noch vereinzelte fluoreszierende Flecken auftraten. Einige Zellen verloren ihre Fluoreszenz ganz und überlebten diesen Vorgang auch nicht. Die überlebenden Zellen erholten sich nach Abschluss der Inkorporation innerhalb etwa eines Tages, regenerierten ihre ursprüngliche ellipsoide Form und die Fluoreszenzintensität glich sich wieder der außerhalb verbliebener Zellen an. Diese Beobachtung stimmt mit früheren Berichten über ein Ausbleichen der *Nostoc*-Zellen während des Aufnahmeprozesses überein (Kluge et al., 1994; Mollenhauer et al., 1996). Möglicherweise werden durch den Stress bei der Inkorporation zunächst Photosynthesepigmente abgebaut. Wegen der z.T. starken Deformation der Zellen ist auch denkbar, dass Reorganisationsprozesse insbesondere der Thylakoidmembranen stattfinden. Eine erkennbare Veränderung der Anteile der einzelnen Photosynthesepigmente beim Übergang zum symbiotischen Leben findet allerdings nicht statt (siehe Kap. 5.3.1.5).

Nach der Regeneration wachsen die *Nostoc*-Zellen innerhalb von 1 bis 2 Tagen auf etwa die anderthalbfache Länge und Breite freilebender Zellen an und erreichen dabei das 4-5-fache Volumen der freilebenden Zellen. Aus den vorliegenden Messungen ergeben sich damit etwas geringere Werte als bei den Berechnungen von Schüßler et al. (1996), nach denen die in der Symbiose etablierten Zellen etwa das 6-fache Volumen der freilebenden Cyanobakterien erreichen. Diese Unterschiede können durch die verschiedenen verwendeten Beobachtungsmethoden erklärt werden. Schüßler et al. (1996) führten Messungen an elektronenmikroskopischen Bildern durch, während den vorliegenden Messungen das Fluoreszenzsignal der Zellen zugrunde liegt. Die äußere Zellmembran sowie die Zellwand werden also nicht mitgemessen, da sich die fluoreszierenden Membranen im Zellinnern befinden. Die tatsächliche Ausdehnung der Zellen muss also größer als die hier vorliegenden Messwerte

sein, so dass ein mittlerer Wert von etwa 6-fach für das Volumen der in der Symbiose etablierten Zellen realistisch erscheint. Nach Mollenhauer und Mollenhauer (1996) und Mollenhauer et al. (1996) könnte diese starke Größenzunahme der *Nostoc*-Zellen auf den hohen hydrostatischen Druck im Innern der *Geosiphon*-Blase (0,6 MPa; Schüßler et al., 1995) zurückzuführen sein.

Nachdem die *Nostoc*-Zellen sich regeneriert und in der jungen Blase etabliert haben, beginnen sie mit der Zellteilung. Ein Vergleich der Anzahl der inkorporierten *Nostoc*-Zellen mit der Zahl der außerhalb des Pilzes verbliebenen Zellen des gleichen Filamentes zeigte bei mehreren beobachteten Inkorporationen eine Zunahme der Zellteilungsaktivität der in der Symbiose etablierten Zellen im Innern des Pilzes. Die Zellteilungsrate ist hier in den ersten Tagen nach Beginn der Teilungsaktivität der Zellen in der gerade gebildeten jungen Blase auf das 3- bis 4-fache erhöht. Durch die drastische Veränderung ihrer direkten Umgebung während der Inkorporation sind die Cyanobakterien offensichtlich großem Stress ausgesetzt. Sie scheinen jedoch über Mechanismen zu verfügen, sich dieser veränderten Situation anzupassen. Das physiologische Milieu innerhalb der Blase löst dabei nicht nur eine deutliche Zunahme der Zellgröße aus, sondern scheint sich auch positiv auf die Stoffwechselaktivität des Cyanobakterienpartners auszuwirken. Das Volumen der *Nostoc*-Biomasse innerhalb der Blase ist nach 5 Tagen etwa 30- bis 40-mal so groß (bei 4,5- bis 6-fachem Volumen der innerhalb der Blase lebenden *Nostoc*-Zellen) wie das der freilebenden *Nostoc*.

5 Messung von Fluoreszenzspektren mit dem CLSM bei freilebendem und symbiotischem *Nostoc punctiforme*, Stamm 1:1-26 (69.79 SAG)

5.1 EINFÜHRUNG

5.1.1 Ziel der Untersuchung

Mikroskopische Beobachtungen früher Inkorporationsstadien von *Nostoc punctiforme* bei der Aufnahme in die Pilzhyphen von *Geosiphon pyriformis* zeigten ein vorübergehendes Ausbleichen der im Aufnahmeprozess begriffenen *Nostoc*-Zellen (siehe Abb. 4.13; Kluge et al., 1994). Während der Inkorporation werden die Zellen zudem meist stark deformiert (siehe Abb. 4.7). Nach der vollendeten Inkorporation regenerieren sie sowohl ihre Pigmentierung als auch ihre Form und erreichen, wie bereits beschrieben, etwa das 6-fache Volumen freilebender Zellen. Aus Messungen von Absorptionsspektren früher Aufnahmestadien, die mit dem *Nostoc* Stamm 29.90 durchgeführt wurden, gab es Hinweise, dass sich die Pigmentzusammensetzung der Cyanobakterien während des Aufnahmeprozesses auch qualitativ verändert (Mollenhauer und Kluge, pers. Mitteilung).

Da die Möglichkeit besteht, mit dem confokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM) Fluoreszenzspektren zu messen, wurde mit dieser Methode untersucht, ob abhängig von der Lebenssituation der Cyanobakterien Veränderungen in der Pigmentzusammensetzung auftreten. Verschiedene Stadien im Lebenszyklus der Cyanobakterien wurden durch ihre Fluoreszenzspektren charakterisiert, und die Fluoreszenzspektren von Cyanobakterien in der Symbiose wurden mit denen von freilebendem *Nostoc* verglichen.

Die Methode erlaubt einen qualitativen Vergleich der Fluoreszenzspektren. Ein quantitativer Vergleich zwischen verschiedenen Messungen ist jedoch nicht möglich, da die gemessenen Fluoreszenzintensitäten nicht absolut sind, sondern von der jeweiligen Anregungsenergie und der Empfindlichkeitseinstellung der Photomultiplier abhängen. Um die Verhältnisse der an den Mischspektren beteiligten Pigmentfluoreszenzen zu bestimmen, wurden mit einer mathematischen Methode die Anteile der einzelnen Fluoreszenzen am Überlagerungsspektrum berechnet.

5.1.2 Phycobiliproteine und Phycobilisomen

Die Lichtsammelproteine in den Antennenkomplexen des photosynthetischen Apparates der prokaryotischen Cyanobakterien sind, wie auch bei den eukaryotischen Rotalgen, Phycobiliproteine. Es handelt sich um wasserlösliche Proteine mit kovalent gebundenen

offenkettigen Tetrapyrrolen (Phycobiline) als Chromophoren. Phycobiliproteine liegen meist als Hexamere aus zwei Untereinheiten in der Form $(\alpha\beta)_6$ vor (Grossmann et al., 1994). Nach ihren Absorptionseigenschaften und der Art ihrer Phycobiline werden Phycoerythrin (PE), Phycoerythrocyanin (PEC), Phycocyanin (PC) und Allophycocyanin (APC) unterschieden, die je nach Organismus in verschiedenen Formen vorkommen können (MacColl, 1998). Sie sind bei den Cyanobakterien in Lichtsammelkomplexen, den Phycobilisomen, organisiert, die den Thylakoidmembranen aufgelagert sind. (Abb. 5.1). Die Zusammensetzung der Phycobilisomen ist bei einigen Arten variabel und kann an unterschiedliche Lichtqualitäten angepasst werden (Sidler, 1994). Bei der komplementären chromatischen Adaptation werden die Anteile an Phycoerythrin oder Phycoerythrin und Phycocyanin als Anpassung an die Lichtqualität verändert.

In Tab. 5.1 und Tab. 5.2 ist eine Übersicht der Emissions- und Absorptionsmaxima von Phycobiliproteinen aus verschiedenen Studien zusammengestellt. Als Vergleichswerte für die hier vorliegenden Versuche werden folgende Mittelwerte der Fluoreszenzmaxima (F_{\max}) verwendet: $F_{\max}^{\text{PE}} \cong 576 \text{ nm}$, $F_{\max}^{\text{PC}} \cong 643 \text{ nm}$, $F_{\max}^{\text{APC}} \cong 661 \text{ nm}$ und $F_{\max}^{\text{PBS}} \cong 669 \text{ nm}$. Das Fluoreszenzmaximum des bei Cyanobakterien in den Photosystemen I und II ausschließlich vorkommenden Chlorophyll a (Chl) liegt bei 685 nm (Gray & Gantt, 1975; Olive et al., 1997). Die in der Tabelle gezeigten Literaturwerte wurden an isolierten Chromoproteinen verschiedener Cyanobakterien und Rotalgen gemessen und sind daher untereinander sowie mit den hier vorliegenden Messungen *in vivo* nur bedingt vergleichbar. In lebenden Zellen befinden sich die Pigmente in einer physiologischen Umgebung, die das Emissionsverhalten (pH-abhängig) im Vergleich zur gereinigten Substanz verändern kann. Im intakten Phycobilisom sind die Phycobiliproteine entsprechend dem Energiefluss angeordnet und durch Linkerpolypeptide verbunden, die ebenfalls Einfluss auf die spektrale Charakteristik haben können (Grossman et al., 1994; Pizarro & Sauer, 2001). Zudem kommt es in intakten Komplexen mehrerer Phycobiliproteine zur Überlagerung der Spektren der einzelnen Substanzen (Wang et al., 1997).

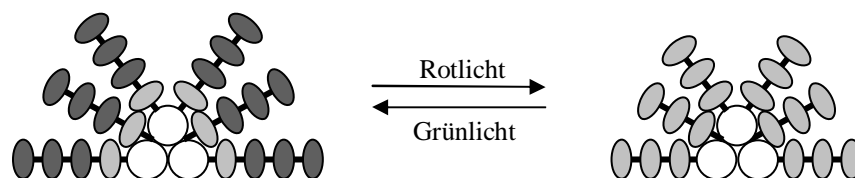


Abb. 5.1: Aufbau eines Phycobilisoms und chromatische Adaptation bei *Calothrix* sp. Weiße Symbole: Allophycocyanin; hellgraue Symbole: Phycocyanin; dunkelgraue Symbole: Phycoerythrin, schwarze Balken: verschiedene Linkerpolypeptide. Nach Grossman et al. (1994).

Tab. 5.1: Fluoreszenzmaxima (nm) von Phycobiliproteinen.

C-PE: C-Phycoerythrin, B-PE: B-Phycoerythrin, R-PE: R-Phycoerythrin, PEC: Phycoerythrocyanin, C-PC: C-Phycocyanin, R-PC: R-Phycocyanin, APC: Allophycocyanin, APC-B: Allophycocyanin B, PBS: Phycobilisom, T: Temperatur, -: keine Angabe, n.v.: kein Maximum vorhanden, vereinigte Zellen: vorkommende Form unbekannt.

Organismus	C-PE	B-PE	R-PE	PEC	C-PC	R-PC	APC/-B	PBS	T(°C)	pH	Bedingungen	Referenz
<i>Cyanidium caldarium</i>	-	-	-	-	n.v.		670	-	RT	-	Suspension lebender Zellen in Medium	Mohanty et al. (1972)
					655		665	-	-196			
<i>Nostoc sp.</i>	574			-	643		659	670	23	7.0	NaPO ₄ -Puffer mit 0,02% NaN ₃ , 100 mM für PE, PC und APC, 750 mM für PBS	Gray & Gantt (1975)
verschiedene	577	575	578	625	640	636	660/675	-	-	-	-	Bryant (1982)
verschiedene	576	576	576	625	648	642	660/680	-	-	7.0	-	Glazer (1987)
<i>Synechococcus sp.</i>	574	-	-	-	-	-	-	664	RT	-	-	Ernst (1992)
<i>Spirulina platensis</i>	-	-	-	-	650	-	670	680	RT	6.8	C-PC: 30 mM NaPO ₄ , 0,2 M NaCl APC: 100 mM NaPO ₄ , 0,2 M NaCl PBS: 750 mM NaPO ₄ , 2 mM NaN ₃	Wang et al. (1997)
<i>Synechocystis</i> PCC6803	-	-	-	-	650		665	-	-	-	-	Olive et al. (1997)
<i>Spirulina platensis</i> (von Sigma)	-	-	575	-	-	-	-	-	4	7.0	50 mM Tris-Puffer	Downes & Hall (1998)
<i>Porphyra tenera</i> (von Sigma)	-	-	-	-	643	-	-	-				
"field samples"	563	-	-	-	-	-	-	-				
<i>Anabaena variabilis</i>	-	-	-	623	644	-	660	665	-	7.0	50 mM NaPO ₄ -Puffer, 0,1 M NaCl	Zhao et al. (1999)
-	-	-	576	-	-	-	660	-	-	7.5	-	Molecular Probes
<i>Spirulina platensis</i>	-	-	-	-	636	-	658	-	-	7.2	100 mM NaPO ₄ -Puffer, 50 mM Saccharose, 0,05% NaN ₃	Intergen Company (intergenco.com)
<i>Porphyridium cruentum</i>	-	572	-	-	-	635	-	-				
<i>Porphyra yezoensis</i>	-	-	578	-	-	-	-	-				
2 künstliche Komplexe aus B-PE, R-PC, APC	-	-	-	-	-	-	-	662/666				

Tab. 5.2: Absorptionsmaxima von Phycobiliproteinen.

C-PE: C-Phycoerythrin, B-PE: B-Phycoerythrin, R-PE: R-Phycoerythrin, PEC: Phycoerythrocyanin, C-PC: C-Phycocyanin, R-PC: R-Phycocyanin, APC: Allophycocyanin, APC-B: Allophycocyanin B, PBS: Phycobilisom, T: Temperatur, -: keine Angabe, n.v.: kein Maximum vorhanden, vereinigte Zellen: vorkommende Form unbekannt.

Organismus	C-PE	B-PE	R-PE	PEC	C-PC	R-PC	APC/-B	PBS	T(°C)	pH	Bedingungen	Referenz
<i>Nostoc sp.</i>	551			-	620		650	571	23	7.0	100 mM (für PBS 750 mM) NaPO ₄ -Puffer, 0,02% NaN ₃	Gray & Gantt (1975)
verschiedene	560	545	565	570	620	617	650/671	-	-	-	-	Bryant (1982)
verschiedene	565	545	567	568	620	617	650/671	-	RT	7.0	-	Glazer (1987)
<i>Spirulina platensis</i>	-	-	-	-	620	-	650	615	RT	6.8	C-PC: 30 mM NaPO ₄ , 0,2 M NaCl APC: 100 mM NaPO ₄ , 0,2 M NaCl PBS: 750 mM NaPO ₄ , 2 mM NaN ₃	Wang et al. (1997)
<i>Spirulina platensis</i> (von Sigma)	-	-	542	-	-	-	-	-	4	7.0	50 mM Tris-Puffer	Downes & Hall (1998)
<i>Porphyra tenera</i> (von Sigma)	-	-	-	-	599	-	-	-				
"field samples"	496	-	-	-	-	-	-	-				
<i>Anabaena variabilis</i>	-	-	-	570	614	-	652	620	-	7.0	50 mM NaPO ₄ -Puffer, 0,1 M NaCl	Zhao et al. (1999)
<i>Synechococcus sp.</i>	574	-	-	-	-	-	-	664	RT	-	-	Ernst (1992)
-	-	-	565	-	-	-	651	-	-	7.5	-	Molecular Probes
<i>Spirulina platensis</i>	-	-	-	-	620	-	652	-	-	7.2	100 mM NaPO ₄ -Puffer, 50 mM Saccharose, 0,05% NaN ₃	Intergen Company (intergenco.com)
<i>Porphyridium cruentum</i>	-	545	-	-	-	619	-	-				
<i>Porphyra yezoensis</i>	-	-	565	-	-	-	-	-				
2 künstliche Komplexe aus B-PE, R-PC, APC	-	-	-	-	-	-	-	545/614				

5.2 MATERIAL UND METHODE

5.2.1 Versuchsaufbau

Für die Versuche wurden *Geosiphon*-Blasen isoliert und vorhandene Pilzhyphen entfernt. Etwa 5 mm² große Stücke flächig gewachsener *Nostoc punctiforme* aus BG11-Agarkulturen wurden 3 mal in H₂O_{tridest} gewaschen und dann zusammen mit den Blasen in Flüssigmedium GM32 (siehe 2.2.1) in eine Glasboden-Petrischale gegeben. Durch Einsetzen eines Zellkulturfiltereinsatzes wurden die Organismen wie in Kap. 2.4.1 beschrieben auf dem Deckglas fixiert.

Die Ansätze wurden 36 Stunden mit Rotlicht (PPFD 20 µmol m⁻²s⁻¹, siehe Kap. 2.4) bestrahlt, um die Bildung von Hormogonien aus den vegetativen *Nostoc*-Filamenten zu induzieren (Schüßler et al., 1997; Damerval et al., 1991). In dieser Zeit erfolgt auch das Auskeimen neuer Pilzhyphen aus den *Geosiphon*-Blasen. Danach folgte eine Dauerbeleuchtung für die ersten 12 Stunden direkt im Mikroskop mit grünem Licht (PPFD 20 µmol m⁻²s⁻¹), wodurch die Differenzierung der Hormogonien zu Primordien und neuen vegetativen Filamenten eingeleitet wird (siehe Kap. 3). Um die Pigmentzusammensetzung der verschiedenen Stadien des Lebenszyklus der Cyanobakterien zu untersuchen, wurden von diesen synchronisierten *Nostoc* alle 30 Minuten nach Beginn der Grünlichtphase Fluoreszenzspektren gemessen. Nach etwa 8 Stunden Grünlichtbeleuchtung fanden die ersten Erkennungsreaktionen zwischen wachsenden Hyphen und *Nostoc*-Filamenten statt, und es konnten auch frühe Inkorporationsstadien untersucht werden.

5.2.2 Messung der Fluoreszenzspektren

Mit dem inversen confokalen Laser Scanning Mikroskop Leica TCS SP MP wurden Fluoreszenzspektren der Autofluoreszenz lebender *Nostoc*-Zellen erstellt. Es wurde ein HCX PL APO 63.0x1.20 W CORR Objektiv mit Zoom 4 verwendet. Die Fluoreszenzanregung erfolgte mit einem Ar/Kr-Laser bei 488 nm. Das Pinhole des CLSM wurde zur Verbesserung der Signalausbeute komplett geöffnet und es wurde ein Wellenlängenscan mit 40 Schritten im Bereich von 530 nm bis 730 nm durchgeführt. Ein Bleichtest (Abb. 5.2) zeigte, dass die Fluoreszenzintensität v.a. im Bereich der PE-Fluoreszenz, aber auch bei PC durch mehrfache Scans abnimmt, also ein Ausbleichen der Pigmente durch das Scannen auftritt. Um die Spektren trotz der Bleicheffekte vergleichen zu können, wurden alle Wellenlängenscans in der gleichen Richtung durchgeführt. Der Beginn wurde auf 530 nm festgelegt, um die Fluoreszenz der schneller ausbleichenden Pigmente zuerst zu detektieren. Wegen der

Beweglichkeit der Hormogonienstadien konnte keine Mittelung des Fluoreszenzsignals durch mehrere Scans pro Ebene zur Verbesserung des Signal/Rauschverhältnisses durchgeführt werden. Daher wurde für alle Scans zur Erhöhung der Signalausbeute eine niedrige Scangeschwindigkeit ("low", 220 Hz, unidirektional) und eine Detektionsbandbreite von 10 nm gewählt, so dass mit überlappenden Detektionsintervallen gescannt wurde. Die Anregung erfolgte mit geringer Leistung (Potentiometer auf "10 Uhr", AOTF-Transmission 75%, Verwendung des RT30/70-Strahlteilers, entspricht ca. 0,0225 mW pro Pixel mit einer Fläche von 6007,025 nm², siehe Anhang 8.2), um die lebenden Organismen zu schonen und Bleicheffekte möglichst gering zu halten.

Aus dem resultierenden Bildstapel wurden mit der Leica Confocal Software für einzelne Zellen die Fluoreszenzintensitäten in den 40 detektierten Wellenlängenbereichen berechnet und daraus das Fluoreszenzspektrum erstellt. Aus drei bis vier verschiedenen Messungen wurden jeweils Spektren mehrerer einzelner Zellen aus verschiedenen Filamenten gemessen. Diese wurden mit dem Microsoft[®] Programm Excel 97 auf ihr Maximum normiert und dann gemittelt.

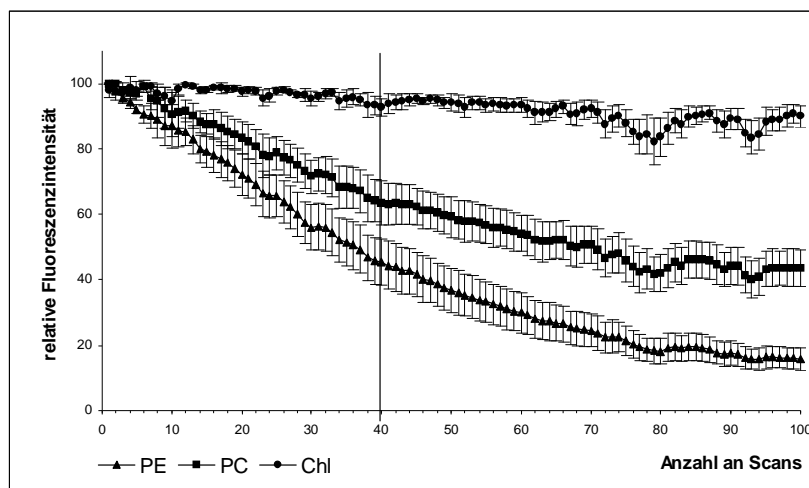


Abb. 5.2: Bleichtest. Mit den gleichen Einstellungen wie bei einem Wellenlängen-Scan wurden 100 Scans der gleichen Stelle in den *Nostoc*-Filamenten durchgeführt und die Fluoreszenzintensität simultan in drei Kanälen aufgezeichnet (Mittelwerte von 6 einzeln gemessenen Zellen). Kanal 1 (PE-Fluoreszenz): 560-585 nm, Kanal 2 (PC-Fluoreszenz): 620-650 nm, Kanal 3 (APC- und Chl-Fluoreszenz): 665-695 nm. Die Linie markiert die Anzahl (40) der Scans, die bei den Versuchen zur Erstellung der *Nostoc*-Fluoreszenzspektren verwendet wurde.

5.2.3 Berechnung von Überlagerungsspektren aus Einzelspektren

Mit dem Programm SigmaPlot 5 kann nach einer geeigneten Funktionsgleichung für eine gegebene Überlagerungskurve durch eine nichtlineare Regression eine "Bestkurve" aus verschiedenen Einzelkurven berechnet werden. Ausgehend von bekannten Spektren isolierter Phycobiliproteine als Referenzspektren kann mit dem Programm iterativ berechnet werden, in welchen Verhältnissen diese Einzelspektren addiert werden müssen, um eine möglichst gute Repräsentation (Bestkurve) der gegebenen (= gemessenen) Überlagerungskurve zu erhalten.

Die Werte für die Referenzspektren der isolierten Pigmente stammen aus verschiedenen Quellen (Abb. 5.3A): Die Fluoreszenzspektren für APC und R-PE (keine Angabe zum Organismus) sind bei der Firma Molecular Probes im Internet unter www.probes.com erhältlich. Die Werte für das Fluoreszenzspektrum von R-PC-II (*Synechococcus* WH8103) wurden einer Graphik von Ong und Glazer (1988) in Sidler (1994) entnommen. Das Absorptionsspektrum von R-PC-II zeigt Maxima bei 533 nm, 554 nm und ein kleineres bei 615 nm, das von APC hat ein Absorptionsmaximum bei 651 nm. Diese Phycobiliproteine werden also von der hier verwendeten Anregungswellenlänge von 488 nm nur relativ schwach angeregt (Peterson et al., 1981; Mohanty et al., 1972). Das könnte die Ursache dafür sein, dass bei den hier vorliegenden Messungen im langwelligeren Bereich zwischen 700 nm und 730 nm keine Fluoreszenz detektiert wurde, obwohl publizierte Fluoreszenzspektren sowohl von isoliertem R-PC-II bei Anregung mit 530 nm als auch von APC bei Anregung mit 633 nm oder 647 nm in diesem Bereich noch deutliche Schultern aufweisen. Da diese Schultern bei den hier vorliegenden Messungen jedenfalls nicht erfasst werden konnten, wurden die niedrigen Fluoreszenzwerte der Referenzspektren von R-PC-II und APC nicht in die Berechnungen mit einbezogen, d.h. niedrige Fluoreszenzintensitäten wurden ausgeschlossen und die Schultern im langwelligeren Bereich dadurch "abgeschnitten". In Abb. 5.3B sind die für die Berechnung verwendeten Referenzspektren und deren leichte Modifikation dargestellt. Zum Vergleich sind in Abb. 5.5 Bestkurven aus den unveränderten Referenzspektren gezeigt.

Das Chlorophyll-Spektrum wurde mit der gleichen Methode wie die Cyanobakterien-Spektren an Chloroplasten des Mooses *Dicranella* sp. am CLSM gemessen. Da bei den CLSM-Messungen für jeden Messpunkt die Fluoreszenzintensität mit einer Bandbreite von 10 nm detektiert wurde, um eine bessere Signalausbeute zu erreichen, wurden die Werte der Referenzspektren von Molecular Probes ebenfalls über 10 nm gemittelt zur Berechnung eingesetzt. Außerdem wurden alle Referenzspektren der einzelnen Pigmente auf 1 bis 100% normiert (Abb. 5.3B; Anhang Tab. 8.1). Bei den Messungen tritt im Bereich von 530 nm bis 540 nm ein asymmetrischer Hintergrund auf. Da dieser Hintergrund bei der Bestkurven-

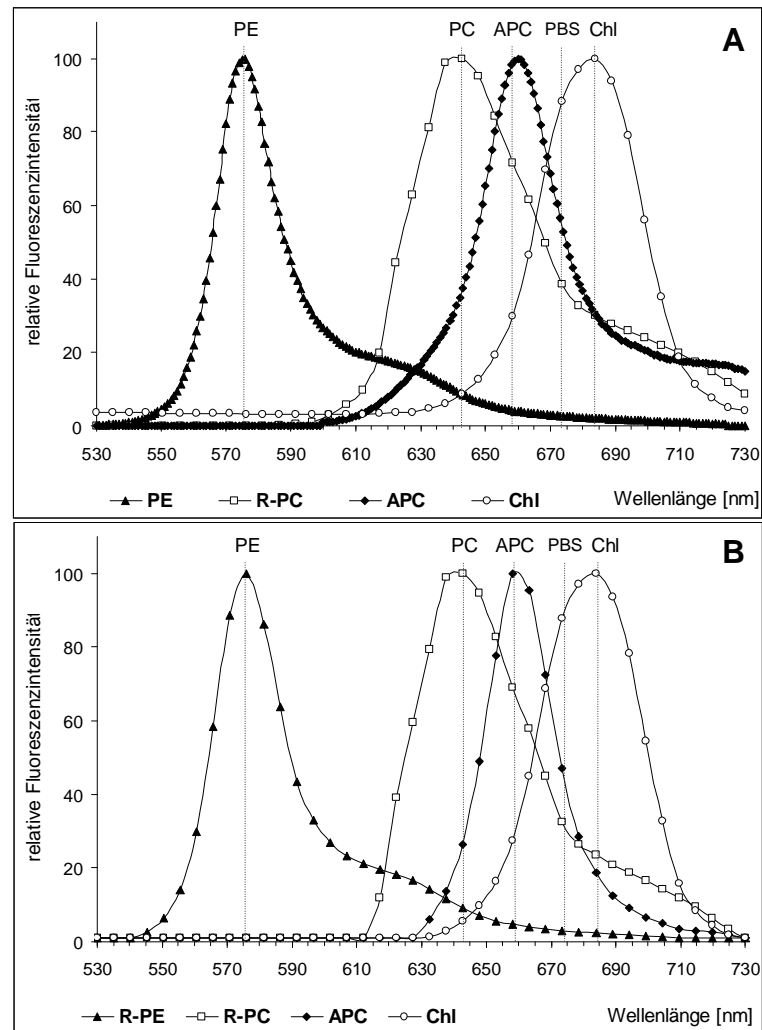


Abb. 5.1: Fluoreszenzspektren der als Referenz verwendeten einzelnen Pigmente. Das Spektrum von R-PE und APC stammt von Molecular Probes, das von R-PC aus einer Graphik in Sidler (1994) und das Chlorophyll-Spektrum wurde an Chloroplasten des Moores *Dicranella* am CLSM gemessen. **A:** Referenzspektren der einzelnen Pigmente auf 100% normiert. **B:** Zur Berechnung der Bestkurven verwendete Spektren (Daten im Anhang Tab. 8.1). Bei R-PE und APC wurden die Werte für jeden Messpunkt wie bei Detektion im CLSM über 10 nm gemittelt. Alle Spektren wurden auf 1-100% genormt und bei R-PC und APC die niedrigen Fluoreszenzwerte (Schultern bei >700 nm, die bei Messungen im CLSM nicht auftraten) "abgeschnitten". Die Fluoreszenzmaxima der einzelnen Cyanobakterien-Pigmente sind durch die punktierten Linien gekennzeichnet.

berechnung einen zusätzlichen Fehler darstellt und in diesem Wellenlängenbereich keine Fluoreszenz der Phycobiliproteine vorhanden ist, wurden zur Optimierung der Berechnung alle Bestkurven ab der Wellenlänge von 545 nm berechnet.

Phycobiliproteine kommen je nach Organismus in verschiedenen Formen vor und unterscheiden sich auch in ihren spektralen Eigenschaften (Edwards et al., 1996; Schneider et al. 1993; Ong & Glazer, 1991; Alberte et al., 1984). Da die Spektren der Phycobiliproteine der hier untersuchten Cyanobakterien nicht bekannt sind, können die verwendeten Referenzspektren der isolierten Substanzen nur eine Annäherung darstellen.

Der durch die verschiedenen Faktoren, wie unterschiedliche Methoden und Organismen, entstehende Fehler lässt sich durch eine Korrekturkurve ausgleichen, die der Differenz zwischen den normierten gemessenen Kurven und den dazu berechneten Bestkurven entspricht. Als Korrekturkurve für alle Berechnungen wurde der Mittelwert aus den Differenzen der Bestkurven zu den Fluoreszenzspektren von Hormogonien, vegetativen dunkelgrünen (siehe Kap. 5.3.1.3) und hellgrünen *Nostoc* (siehe Kap. 5.3.1.4) und dunkelgrünen *Geosiphon*-Blasen (siehe Kap. 5.3.1.5) verwendet (Abb. 4.5). In diese Korrekturkurve gehen neben Unterschieden im Fluoreszenzspektrum der Phycobiliproteine verschiedener Organismen auch andere Fehler ein, wie z.B. eine mögliche Hintergrundfluoreszenz in den Zellen, ein eventuell fehlendes Signal oder durch das physiologische Milieu in der lebenden Zelle bedingte Unterschiede in der Fluoreszenz. Abb. 5.5 zeigt die Optimierung der berechneten Bestkurven durch Anwendung der Korrekturkurve.

Die Funktionsgleichung für die Berechnung der nichtlinearen Regression lautet:

$$f = x_1 \cdot m_1 + x_2 \cdot m_2 + x_3 \cdot m_3 + x_4 \cdot m_4 + x_b \cdot m_b$$

fit f to y

Dabei stellt "m" den Wert des jeweiligen Referenzspektrums dar, "x" ist der zu berechnende Anteil des Referenzspektrums am Überlagerungsspektrum. Weitere Bedingungen zur Berechnung sind in Tab. 5.3 zusammengestellt. Eine nichtlineare Regressionsberechnung mit dem Programm SigmaPlot5 ergibt als Ergebnis die Werte der berechneten Bestkurve (f) sowie die Anteile (Werte für x1, x2, x3, x4 und xb), mit denen jedes Referenzspektrum an dem berechneten Überlagerungsspektrum beteiligt ist.

Tab. 5.3: Anfangsparameter und Bedingungen für die Berechnung der Bestkurven

Variablen	Anfangs-Parameter	Bedingungen	Optionen
m1=Werte für APC	x1 = 10 '	x1>0	tolerance=0.0001 stepsize=1000 iterations=1000
m2= Werte für R-PC	x2 = 10 '	x2>0	
m3= Werte für C-PE	x3 = 10 '	x3>0	
m4= Werte für Chl	x4 = 10 '	x4>0	
mb= Korrekturkurve	xb = 10 '	xb>0	
y = Werte des gemessenen Spektrum			

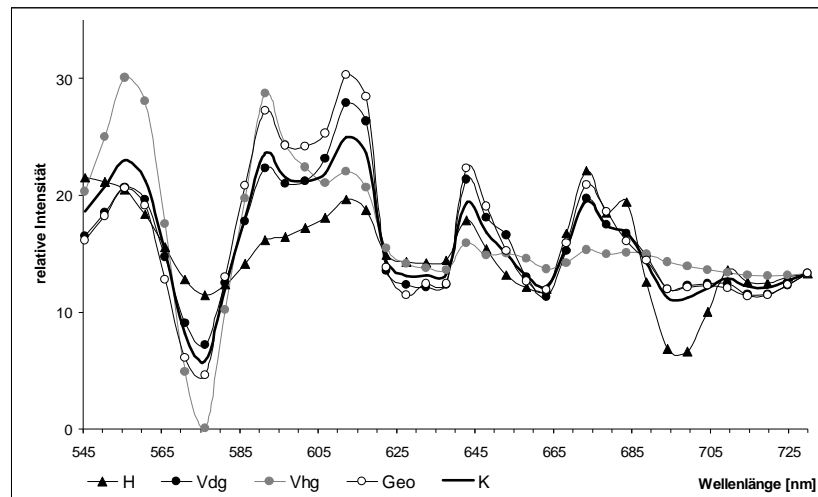


Abb. 5.4: Differenzen zwischen gemessenen Spektren und den dazu berechneten Bestkurven von H: Hormogonien, V dg: dunkelgrünen vegetativen *Nostoc*, V hg: hellgrünen vegetativen *Nostoc* und Geo: dunkelgrünen *Geosiphon*-Blasen. Der Mittelwert dieser Differenzen wurde als Korrekturkurve (K) bei Berechnung der Anteile einzelner Fluoreszenzen am Überlagerungsspektrum eingesetzt.

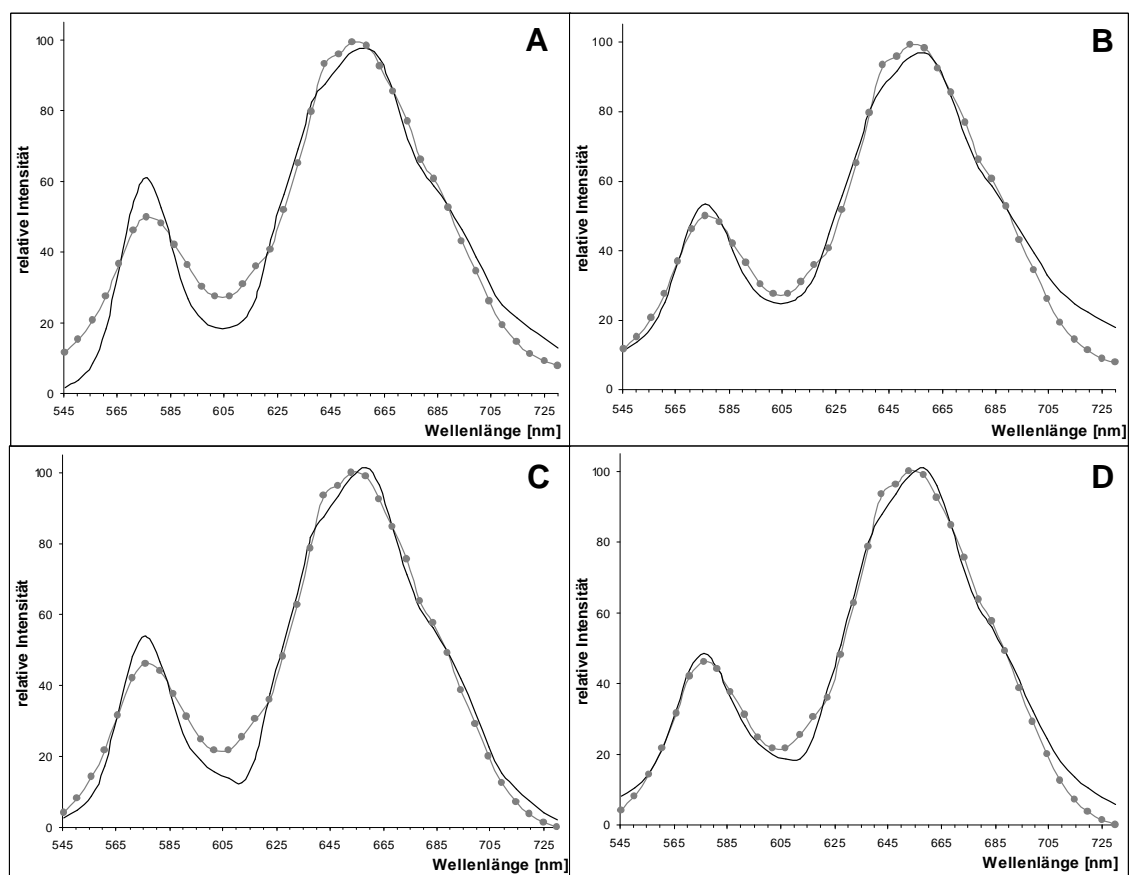


Abb. 5.5: Vergleich der mit verschiedenen Ausgangsbedingungen berechneten Bestkurven am Beispiel des Spektrums vegetativer dunkelgrünen *Nostoc* (Symbole). **A:** Referenzspektren von isolierten Phycobiliproteinen wurden zur Berechnung der Bestkurve auf 0 bis 100% normiert. **B:** wie A, aber unter Berücksichtigung der Korrekturkurve berechnet (siehe Abb. 5.4). **C:** Referenzspektren der isolierten Phycobiliproteine wurden auf 1 bis 100% normiert und niedrige Intensitätswerte bei R-PC-II und APC abgeschnitten, gemessene Spektren sind von 0 bis 100% normiert. **D:** wie C, aber unter Berücksichtigung der Korrekturkurve berechnet.

5.3 ERGEBNISSE

5.3.1 Fluoreszenzspektren im Lebenszyklus von *Nostoc punctiforme*

5.3.1.1 Einführung

Um zu untersuchen, ob sich die Pigmentzusammensetzung der Cyanobakterien im Lebenszyklus verändert und so eine weitere Charakterisierung des Symbiose-kompetenten *Nostoc*-Stadiums möglich ist, wurden Fluoreszenzspektren von synchronisierten *Nostoc* im Verlauf des Lebenszyklus gemessen.

Dabei traten zunächst widersprüchliche Messergebnisse auf. Nähere Untersuchungen zeigten aber, dass der verwendete *Nostoc*-Stamm mit *Nostoc* eines anderen Typs "kontaminiert" war, der in der Mischkultur weder mit bloßem Auge noch lichtmikroskopisch von Zellen des ursprünglichen Stammes unterschieden werden konnte. Ein weiterer Hinweis darauf, dass die Unterschiede in den Fluoreszenzspektren durch eine Mischkultur verschiedener *Nostoc*-Varianten verursacht wurde, war das etwa gleichzeitige Auftreten von hellgrünen *Geosiphon*-Blasen in den Kulturen zusammen mit den sonst fast schwarzen, dunkelgrünen Blasen (Abb. 5.6). Durch die Analyse der an Einzelzellen gemessenen Fluoreszenzspektren war es möglich, eindeutige Unterscheidungsmerkmale zwischen den beiden *Nostoc*-Varianten zu finden. Um zu überprüfen, ob es sich bei dem unbekannten Stamm um eine Kontamination durch einen der anderen in unserem Labor verwendeten *Nostoc*-Stämme handelt, wurden die Fluoreszenzspektren dieser Stämme untersucht. Sie zeigten jedoch keine Übereinstimmung mit dem unbekannten *Nostoc*-Typ. Möglicherweise handelt es sich um eine während der Kultur aufgetretene spontane Mutation. Bei *Calothrix* sp. PCC 7601 wurden bereits spontane Mutationen in der Pigmentierung beobachtet, durch Mutagenese kann die Häufigkeit von Pigmentmutationen erhöht werden. (Cobley & Miranda, 1983). Allerdings ist ebenfalls denkbar, dass sich die unbekannte *Nostoc*-Variante von Anfang an in sehr geringer Zahl in der Kultur befand, aber zunächst nicht erkannt wurde, und sich z.B. durch die Verwendung von *Geosiphon*-Medium für die *Nostoc*-Kultur angereichert hat.

5.3.1.2 Charakterisierung der beiden *Nostoc*-Typen in der Mischkultur

Die Lokalisation des maximalen Fluoreszenzsignals in den vegetativen Zellen ist ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen den beiden *Nostoc*-Typen. An den Fluoreszenzbildern (Abb. 5.7) ist zu erkennen, dass sich bei der unbekannten *Nostoc*-Variante die höchste

Fluoreszenzintensität im Innern der Zelle befindet, während bei dem ursprünglichen *Nostoc*-Typ die Hauptfluoreszenz in den äußeren Bereichen der Zellen auftritt. Bei Hormogonienstadien (die keinen PE Peak zeigen) aus der Mischkultur wurden nur Zellen gefunden, bei denen die Fluoreszenz peripher lokalisiert war. Das zweite wichtige Unterscheidungsmerkmal sind die bei beiden Stämmen deutlich verschiedenen Fluoreszenzspektren der vegetativen Zellen, die mit denen von hellgrünen bzw. dunkelgrünen *Geosiphon*-Blasen übereinstimmen (Abb. 5.7). Nach dem Erscheinungsbild der *Geosiphon*-Blasen werden die Cyanobakterien hier als "hellgrüne" bzw. "dunkelgrüne" bezeichnet, obwohl dieser Farbunterschied bei freilebenden *Nostoc* in der Mischkultur nicht direkt erkennbar ist.

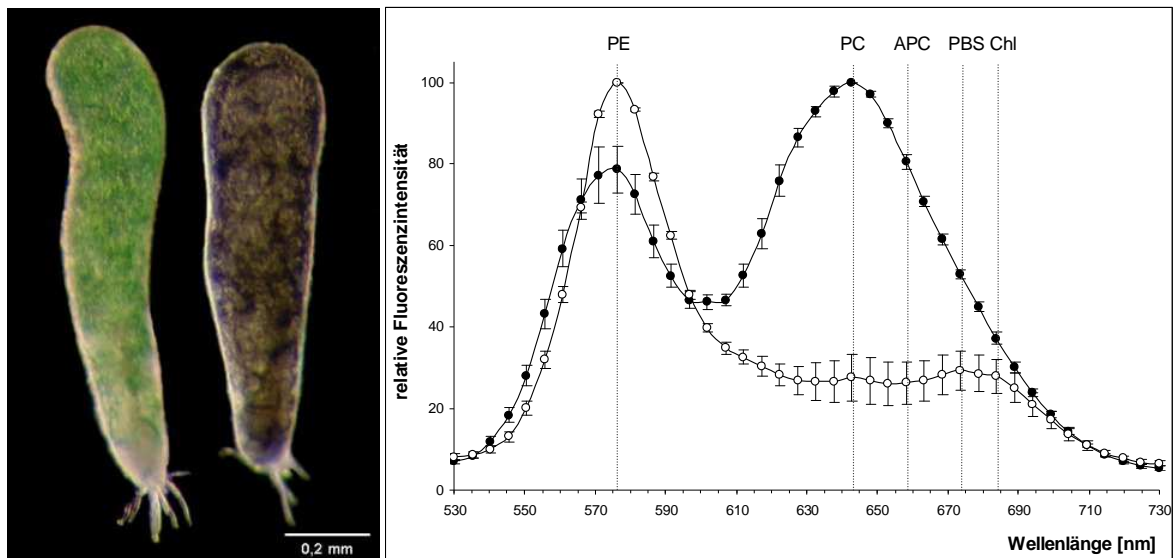


Abb. 5.6: Hellgrüne und dunkelgrüne *Geosiphon*-Blasen aus der Kultur und Fluoreszenzspektren der in hellgrünen (○) und dunkelgrünen (●) Blasen lebenden *Nostoc*-Zellen (je n=18). Die Fluoreszenzmaxima der einzelnen Cyanobakterien-Pigmente (PE: Phycoerythrin, PC: Phycocyanin, APC: Allophycocyanin, PBS: Phycobilisomen, Chl: Chlorophyll a) sind durch punktierte Linien gekennzeichnet.

Abb. 5.7 (nächste Seite): Fluoreszenzlokalisierung und typische Spektren der beiden *Nostoc*-Stämme. **1:** CLSM 3-Kanal-Bild (Falschfarben) vegetativer Zellen einer Mischkultur nach 48 Stunden im Dauergrünlicht mit folgenden Detektionswellenlängen: Kanal 1 (Grün): 550-600 nm, Kanal 2 (Rot): 610-663 nm, Kanal 3 (Blau): 670-700 nm; 63x H₂O zoom 4, ph 1, RT30/70, AOTF 488 nm 50%, 2 Mittelungen, Scan-Geschwindigkeit medium. Grün: hellgrüner *Nostoc*-Typ, pink: dunkelgrüner *Nostoc*-Typ. **2:** Bilder der Fluoreszenzmaxima der einzelnen Pigmente aus einem Wellenlängenscan mit 5 nm Detektionsbreite und 50 Detektionsschritten: PE: Bild 09 (572-577 nm), PC: Bild 28 (640-645 nm), APC: Bild 33 (658-663 nm), Chl: Bild 39 (679-684 nm). **3:** Fluoreszenzspektren der hellgrünen (○) und dunkelgrünen (●) *Nostoc* (absolute Intensitäten, je n=3). **4:** Falschfarbenbild aus Überlagerung der Bildstapel 4 bis 14 (550-602 nm, grün), 17 bis 26 (617-663 nm, rot) und 27 bis 37 (668-720 nm, blau) eines Wellenlängenscans (40 Schritte, 10 nm breit, pinhole geöffnet) nach 10 Tagen Dauergrünlicht. **5:** Fluoreszenzmaxima der einzelnen Pigmente der beiden *Nostoc*-Stämme: PE: Bild 09 (571-781 nm), PC: Bild 22 (638-648 nm), APC: Bild 25 (653-663 nm) und Chl: Bild 30 (679-689 nm). **6:** Fluoreszenzspektren der hellgrünen (○) und dunkelgrünen (●) *Nostoc*. Um auch die z.T. sehr schwachen Fluoreszenzsignale des Chlorophyll a sichtbar zu machen, wurde für die Graustufenbilder eine Gamma-Korrektur sowie eine Helligkeits- und Kontrastverstärkung durchgeführt.

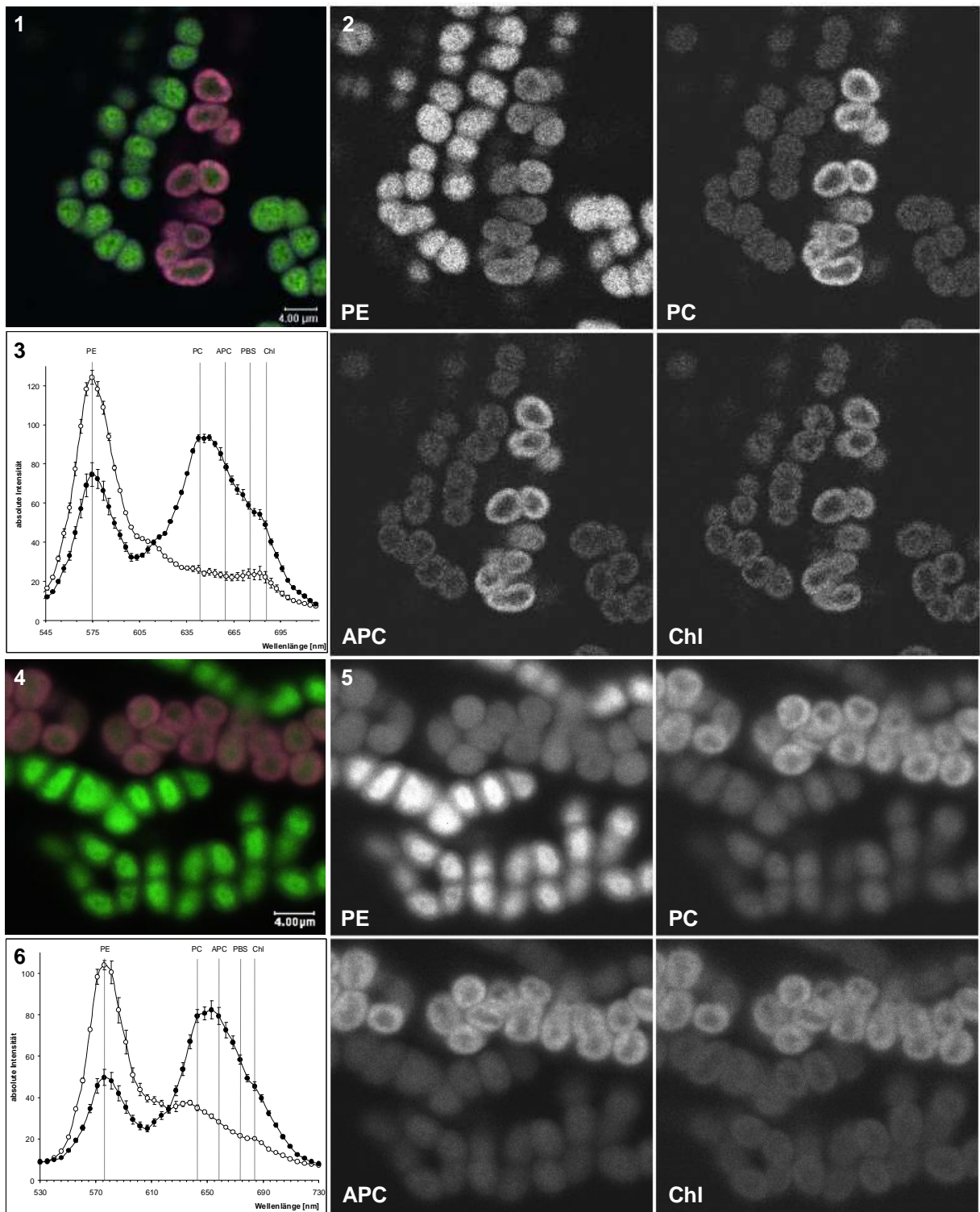


Abb. 5.7: Fluoreszenzlokalisierung und typische Spektren der beiden *Nostoc*-Stämme (Legende siehe Seite 89).

5.3.1.3 Fluoreszenzspektren dunkelgrüner *Nostoc*-Zellen im Verlauf des Lebenszyklus

Für bewegliche Hormogonien zeigt das Fluoreszenzspektrum ein Maximum bei 674 nm und eine Schulter bei 684 nm (Abb. 5.8). Der Wert von 684 nm entspricht dem Fluoreszenzmaximum von Chlorophyll a, der zweite Wert liegt zwischen den von Gray und Gantt (1975) und Wang (1997) für isolierte PBS angegebenen Werten und kommt durch Überlagerung der Fluoreszenzen von APC und Chl zustande (siehe Kap. 5.3.3).

Das Fluoreszenzspektrum vegetativer Zellen hat zwei Maxima (Abb. 5.8): Das Hauptmaximum liegt bei 653 nm mit einer Schulter bei 643 nm und der im Vergleich zum Hormogonienspektrum niedrigeren Schulter der Chlorophyll-Fluoreszenz von 684 nm. Der Wert von 643 nm entspricht dem Fluoreszenzmaximum von Phycocyanin. Das Maximum bei 653 nm kann keinem einzelnen Pigment zugeordnet werden. Es entsteht aus der Überlagerung der Fluoreszenzen von PC und APC (siehe Kap. 5.3.3). Peterson et al. (1981) fanden bei *in situ*-Fluoreszenzmessungen an vegetativen Zellen von *Anacystis variabilis* ein Fluoreszenzmaximum bei 658 nm. Das zweite Fluoreszenzmaximum (576 nm) der vegetativen *Nostoc*-Zellen entspricht dem von PE und erreicht nur etwa 50% der Fluoreszenzintensität des Hauptmaximums.

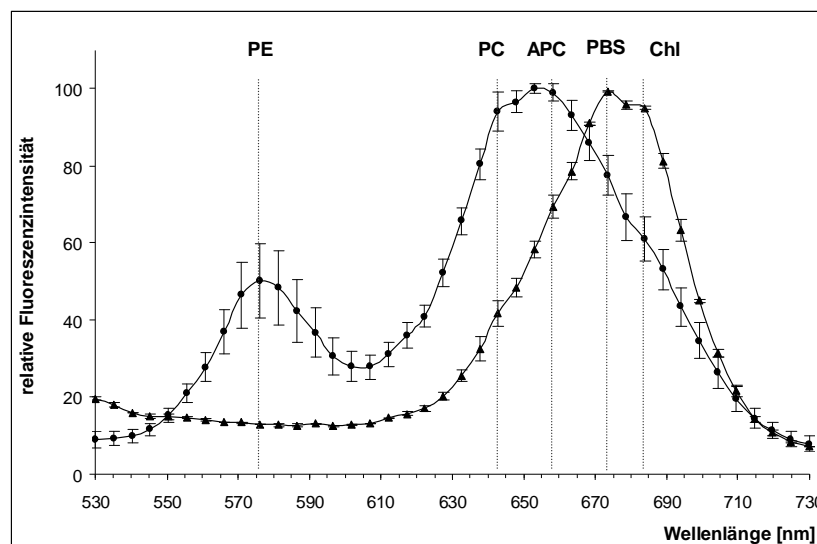


Abb. 5.8: Fluoreszenzspektren beweglicher Hormogonien (▲) und vegetativer Zellen (●). Hormogonien: 36 Stunden Rotlicht und 1 Stunde Grünlicht, n=19. Vegetative Zellen: 24 Stunden bis 14 Tage Grünlicht, n=69. Fluoreszenzmaxima der einzelnen Cyanobakterien-Pigmente sind durch punktierte Linien gekennzeichnet. PE: Phycoerythrin, PC: Phycocyanin, APC: Allophycocyanin, PBS: Phycobilisomen, Chl: Chlorophyll a.

Für die Übergangsstadien von beweglichen *Nostoc*-Hormogonien zu unbeweglichen Primordien findet man sehr unterschiedliche Spektren, deren Hauptmaxima zwischen 674 nm und 653 nm liegen und deren zweites Maximum bei 576 nm in sehr unterschiedlichen Anteilen auftritt. Bei den in dieser Phase auftretenden Spektren lassen sich 3 Typen unterscheiden und wie folgt charakterisieren:

- Spektren, die denen der Hormogonien ähneln, mit einem Maximum bei 674 nm oder 684 nm, wobei die Fluoreszenzintensität bei 643 nm niedriger ist als bei 674 nm. Es gibt kein Fluoreszenzsignal bei 575 nm.
- Spektren unbeweglicher Primordien, die wie die vegetativen Stadien bereits die Verschiebung des Hauptmaximums zu 653 nm zeigen, so dass die Fluoreszenzintensität bei 643 nm höher ist als bei 674 nm. Ein weiteres Maximum tritt bei 575 nm mit variabler Intensität auf.
- Übergangsspektren der Differenzierungsstadien zwischen Hormogonien und Primordien mit einem Hauptmaximum zwischen 674 nm und 658 nm. Hier ist die Fluoreszenzintensität bei 643 nm allerdings geringer als die bei 674 nm. Ein Maximum bei 575 nm tritt in sehr unterschiedlicher Intensität auf. In Abb. 5.9 ist die hohe Variabilität der Fluoreszenzspektren solcher Übergangsstadien zwischen 2 und 12 Stunden nach Beginn der Grünlichtbeleuchtung gezeigt.

Im Lebenszyklus von *Nostoc punctiforme* findet also eine deutliche Veränderung der Fluoreszenzspektren statt (siehe Kap. 5.3.3). Bei der Differenzierung von beweglichen Hormogonien zu neuen vegetativen Stadien kommt es zu einer Verschiebung des Hauptfluoreszenzmaximums vom Chlorophyll a zum Phycocyanin. Zudem entsteht ein zweites Maximum durch die Phycoerythrin-Fluoreszenz. Die unterschiedlichen Intensitäten des PE-Peaks könnten zumindest teilweise durch Ausbleichen des PE entstehen (siehe Abb. 5.2). Das Auftreten der PE-Fluoreszenz ist kein Ergebnis von chromatischer Adaptation infolge der Dauerbeleuchtung mit Grünlicht (siehe Kap. 5.3.2), sondern muss auf Unterschieden zwischen den Lebensstadien der *Nostoc*-Zellen beruhen.

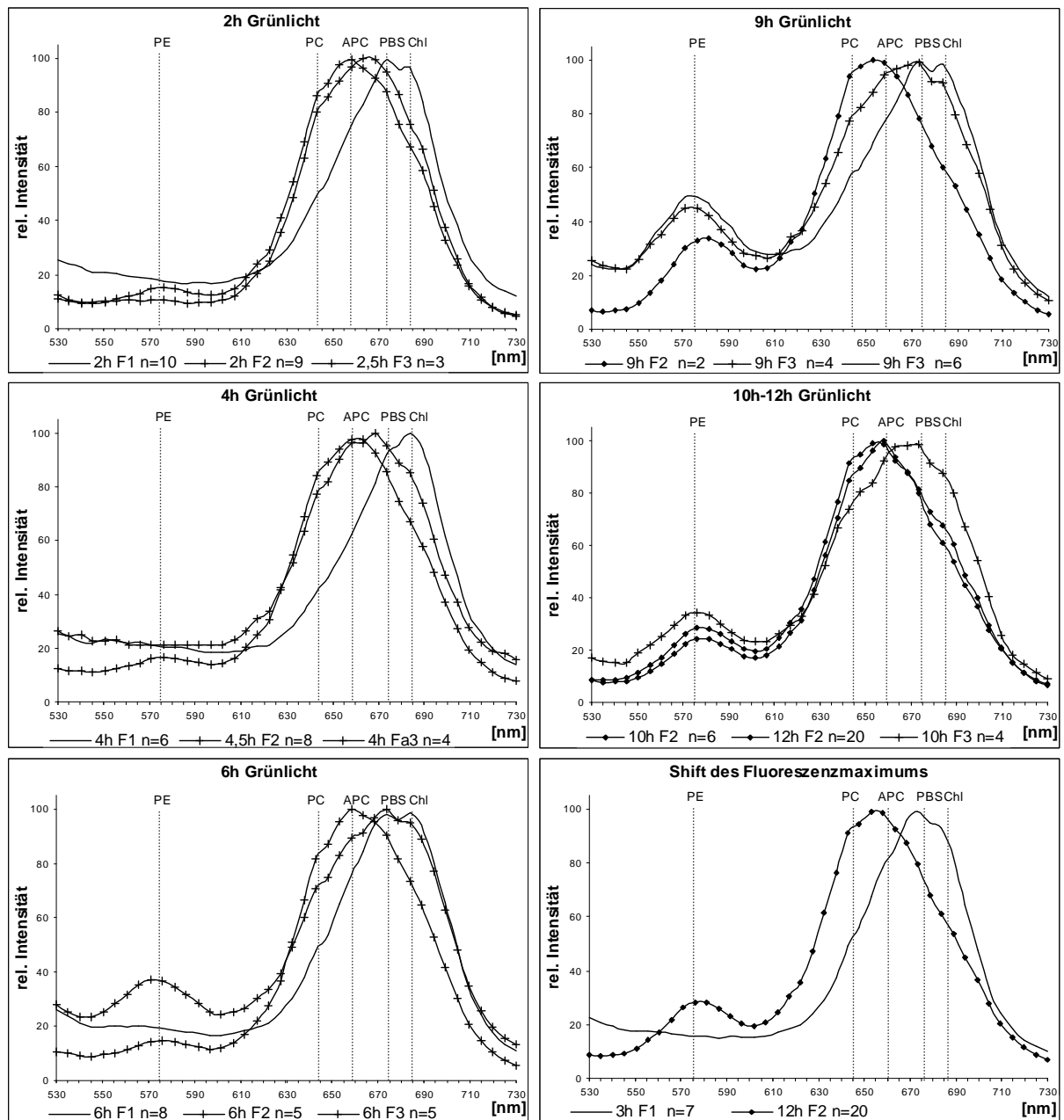


Abb. 5.9: Fluoreszenzspektren von *Nostoc*-Zellen in der Übergangsphase von beweglichen Hormogonien zu unbeweglichen Primordien zwischen 2 und 12 Stunden im Grünlicht. Ohne Symbol: Spektren, die denen beweglicher Hormogonien ähneln; +, x: Übergangsspektren; ♦: Primordien-Spektren. Die Pfeile verdeutlichen die Verschiebung des Fluoreszenzmaximums vom Chl zum PC und das Auftreten der PE-Fluoreszenz während der Entwicklung vom Hormogonium zum Primordium. Die Fluoreszenzmaxima der einzelnen Cyanobakterien-Pigmente sind durch punktierte Linien gekennzeichnet. PE: Phycoerythrin, PC: Phycocyanin. APC: Allophycocyanin, PBS: Phycobilisomen, Chl: Chlorophyll a.

5.3.1.4 Fluoreszenzspektren hellgrüner *Nostoc*-Zellen im Verlauf des Lebenszyklus

Bei beweglichen Hormogonien konnten in der Mischkultur keine Unterschiede in der intrazellulären Fluoreszenzlokalisierung gefunden werden, und es trat auch nur ein Typ von Fluoreszenzspektren auf (Abb. 5.8). Da noch keine reinen Kulturen der beiden Stämme vorlagen und die hier gezeigten Versuche mit der Mischkultur durchgeführt wurden, war nicht auszuschließen, dass zufällig nur Hormogonien des dunkelgrünen Stammes gemessen wurden. Im weiteren Verlauf des Experimentes traten dann Filamente auf, die aufgrund ihrer Fluoreszenzlokalisierung eindeutig dem hellgrünen *Nostoc*-Stamm angehören. Das Hauptmaximum im Spektrum vegetativer hellgrüner *Nostoc* liegt bei 576 nm, dem Fluoreszenzmaximum von PE. Ein zweites Maximum von vergleichsweise geringer Intensität befindet sich bei 643 nm, eine Schulter bei 684 nm (Abb. 5.10). Die während der Differenzierung von Hormogonien zu Primordien auftretenden Fluoreszenzspektren zeigten eine hohe Variabilität, ließen aber einen Übergang vom Hormogonien-Spektrum zum Spektrum vegetativer Zellen erkennen.

Spätere Versuche mit dem isolierten hellgrünen *Nostoc*-Stamm zeigten, dass die Hormogonien dieses Stammes tatsächlich das gleiche Fluoreszenzspektrum besitzen wie die der dunkelgrünen *Nostoc*. Im Gegensatz zu diesen fand aber bei Versuchen zur chromatischen Adaptation bei den hellgrünen *Nostoc* eine Reaktion auf die Beleuchtung mit verschiedenen Lichtqualitäten statt (siehe Kap. 5.3.2). Die Unterschiede in den Fluoreszenzspektren der hellgrünen *Nostoc* könnten also auch auf die verwendete Bestrahlung mit Rot- und Grünlicht zurückgehen. Ob die verschiedenen Fluoreszenzspektren auch unabhängig von der Beleuchtung im Lebenszyklus der hellgrünen *Nostoc* auftreten, kann mit der hier verwendeten Methode nicht untersucht werden.

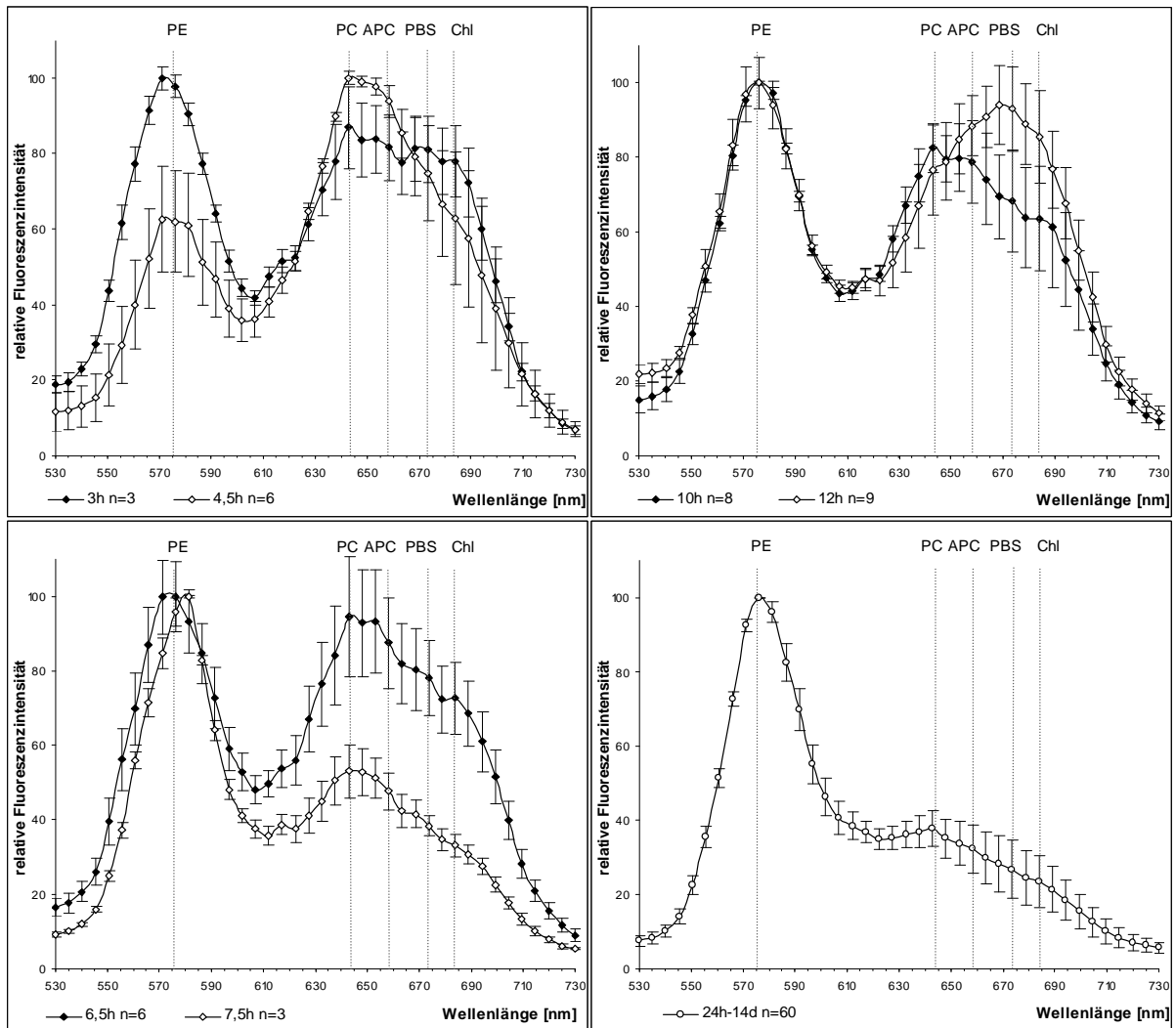


Abb. 5.10: Fluoreszenzspektren hellgrüner *Nostoc* in der Übergangsphase von Hormogonien zu Primordien und vegetativen Zellen. Fluoreszenzmaxima der einzelnen Cyanobakterien-Pigmente sind durch punktierte Linien gekennzeichnet. PE: Phycoerythrin, PC: Phycocyanin, APC: Allophycocyanin, PBS: Phycobilisomen, Chl: Chlorophyll a.

5.3.1.5 Fluoreszenzspektren von endosymbiotischem *Nostoc punctiforme*

Bei der Messung der Spektren während des Lebenszyklus der Cyanobakterien konnten unter den gleichen Kulturbedingungen frühe Aufnahmestadien von *Nostoc*-Filamenten in eine *Geosiphon*-Pilzhyphe untersucht und Fluoreszenzspektren von *Nostoc*-Stadien sowohl vor der Inkorporation als auch nach der erfolgreichen Etablierung der Symbiose gemessen und verglichen werden. Dabei zeigten sowohl Zellen während des Aufnahmeprozesses (nach 7 bis 24 Stunden) als auch symbiotisch lebende (nach 120 Stunden und 14 Tagen) das gleiche Fluoreszenzspektrum wie freilebende vegetative *Nostoc*-Zellen. Abb. 5.11 zeigt ein frühes Inkorporationsstadium nach 8 Stunden im Grünlicht. Die von der Pilzhyphe bereits eingeschlossenen Zellen weisen zunächst deutliche Deformationen auf. Im Diagramm sind Fluoreszenzspektren dieser deformierten Zellen während des Aufnahmeprozesses, von benachbarten Zellen im gleichen Filament, die noch nicht eingeschlossen sind, sowie von Zellen eines am Inkorporationsvorgang unbeteiligten *Nostoc*-Filaments dargestellt. Wie Abb. 5.11 zeigt, unterscheiden sich diese Spektren nicht voneinander. Auch beim Vergleich der aus allen durchgeführten Messungen gemittelten Spektren von symbiotischen und vegetativen, nicht symbiotischen *Nostoc*-Zellen, konnten keine qualitativen Unterschiede festgestellt werden (Abb. 5.12). Das bedeutet, dass Zellen, die vom Pilz erkannt und inkorporiert werden, bereits die gleiche Pigmentzusammensetzung aufgebaut haben wie sie in den vegetativen Stadien vorliegt.

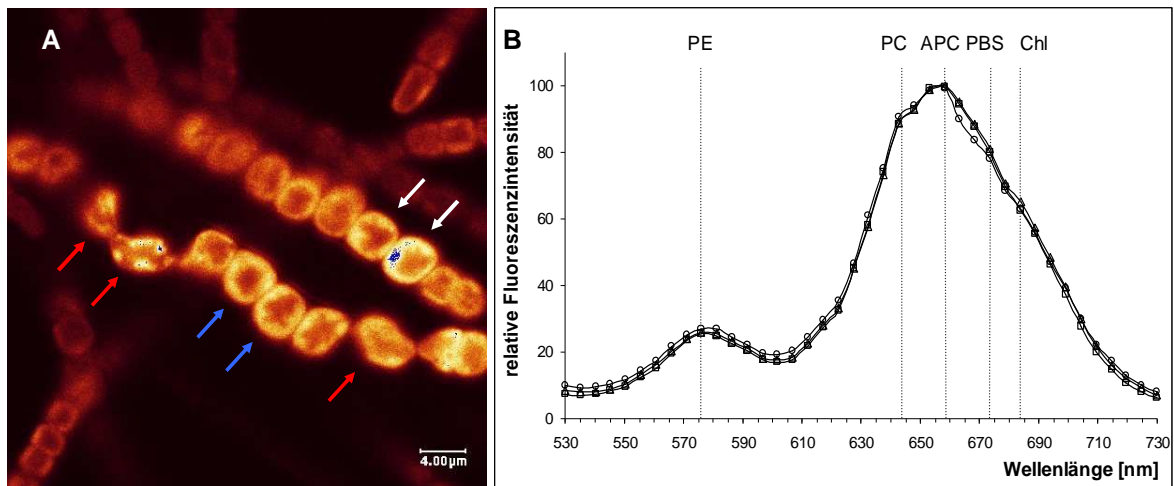


Abb. 5.11: A: CLSM Bild eines frühen Aufnahmestadiums 8 Stunden nach Beginn der Grünlichtphase. Die verschiedenfarbigen Pfeile kennzeichnen die Zellen, an denen die im Diagramm gezeigten Fluoreszenzspektren gemessen wurden. Rot: Gerade aufgenommene, deformierte Zellen; blau: (noch) nicht von der Pilzhyphe eingeschlossene Zellen des gleichen *Nostoc*-Filaments; weiß: freies Filament, das nicht mit einer Pilzhyphe interagiert hat. B: Fluoreszenzspektren der im Bild markierten Zellen. ○: inkorporierte Zellen (rote Pfeile in A), △: nicht inkorporierte Zellen (blaue Pfeile in A), □: Zellen des nicht an der Aufnahme beteiligten Filamentes (weiße Pfeile in A). Die Fluoreszenzmaxima der einzelnen Cyanobakterien-Pigmente sind durch punktierte Linien gekennzeichnet. PE: Phycoerythrin, PC: Phycocyanin. APC: Allophycocyanin, PBS: Phycobilisomen, Chl: Chlorophyll a.

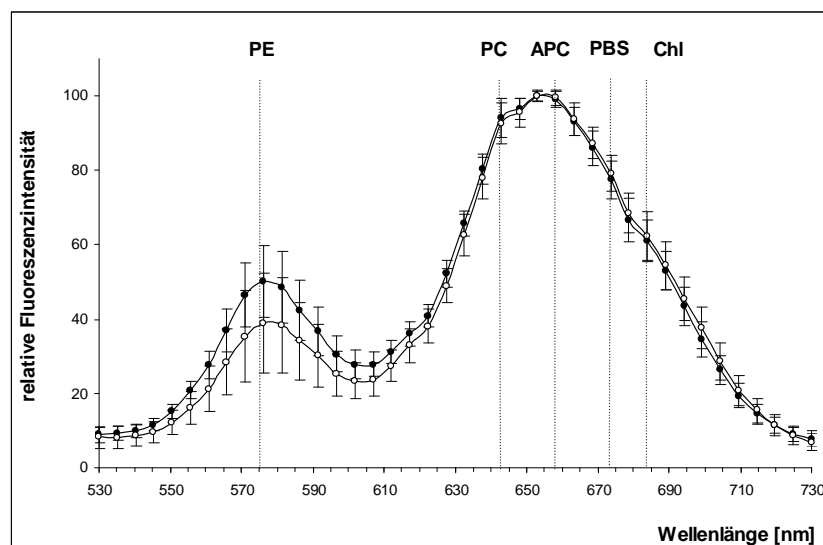


Abb. 5.12: Fluoreszenzspektren vegetativer und symbiotischer *Nostoc*-Zellen. ○: Symbiotische Zellen, 7 Stunden bis 14 Tage im Grünlicht, n=25; ●: freilebende vegetative Zellen, 24 Stunden bis 14 Tage im Grünlicht, n=69. Die Fluoreszenzmaxima der einzelnen Cyanobakterien-Pigmente sind durch punktierte Linien gekennzeichnet. PE: Phycoerythrin, PC: Phycocyanin. APC: Allophycocyanin, PBS: Phycobilisomen, Chl: Chlorophyll a.

5.3.2 Chromatische Adaptation

5.3.2.1 Einführung

Viele Cyanobakterien können die Anzahl und die Zusammensetzung ihrer Phycobilisomen an die Lichtquantität und die Lichtqualität ihrer Umgebung anpassen. Diese Anpassung wird als chromatische Adaptation bezeichnet (Tandeau de Marsac, 1977; 1983; Anderson et al., 1983; Lönneborg et al., 1985; Ohki et al., 1985; Grossman et al., 1994; Nomsawai et al., 1999). Wenn der Anteil von PE oder von PE und PC verändert wird, heißt der Prozess komplementäre chromatische Adaptation (Grossman et al., 1994). Dieser Effekt wurde intensiv bei *Calothrix* sp. PCC 7601 untersucht (Haury & Bogorad, 1977; Vogelmann & Scheibe, 1978). Bei Bestrahlung mit Rotlicht (Aktionsmaximum: 650-660 nm) wird der Anteil an PC (blau) erhöht, während im Grünlicht (Aktionsmaximum: 540-550 nm) nur wenig PC, aber ein hoher Anteil an PE (rot) gebildet wird.

Da zur Untersuchung der Fluoreszenzspektren im Lebenszyklus von *Nostoc* eine Methode zur Synchronisierung der Lebensstadien mit rotem und grünem Licht eingesetzt wurde, musste geklärt werden, ob die auftretenden Veränderungen Effekte photoregulatorischer Prozesse sind oder ob sie tatsächlich auf Unterschiede zwischen den Lebensstadien zurückgeführt werden können.

Dazu wurden sowohl vegetative *Nostoc* der beiden Stämme als auch dunkelgrüne und hellgrüne *Geosiphon*-Blasen in Petrischalen mit Deckglasboden und Filtereinsatz je 3 Tage mit rotem, grünem und weißem Licht (20 μmol Photonen/m²s bei 20°C) dauerbestrahlt und dann die Fluoreszenzspektren gemessen. Zusätzlich wurden Fluoreszenzspektren der Cyanobakterien vor Versuchsbeginn in der Hellphase des 14h Hell/10h Dunkel-Rhythmus gemessen. Die hier gezeigten Ergebnisse wurden durch Untersuchungen an der Mischkultur ermittelt. Die Wiederholung der Versuche mit einer nach der zeitaufwendigen Isolierung einzelner Filamente etablierten Reinkultur des hellgrünen Stammes bestätigte die Ergebnisse.

5.3.2.2 Ergebnisse der Versuche mit freilebenden *Nostoc*

Die beiden untersuchten *Nostoc*-Stämme reagierten unterschiedlich auf die Bestrahlung mit verschiedenen Lichtqualitäten. Dunkelgrüne *Nostoc* zeigten nach Beleuchtung mit weißem und rotem Licht sowie in der Hellphase des Hell-/Dunkel-Rhythmus sehr ähnliche Spektren (Abb. 5.13). Zwischen 600 nm und 720 nm war der Kurvenverlauf nach Dauerweißlicht im Vergleich zum Spektrum des Hell/Dunkel-Rhythmus zwar um etwa 10 nm zum langwelligeren Bereich verschoben, während nach Rotlicht in diesem Bereich die Kurve

insgesamt etwas breiter war. Das Hauptmaximum lag aber bei allen Spektren zwischen 642 nm und 648 nm, was auf einen hohen Anteil an PC-Fluoreszenz schließen lässt. Das zweite Maximum bei 576 nm zeigte nach Grünlichtbeleuchtung hier eine höhere relative Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den Spektren der anderen Lichtqualitäten. Die Standardabweichungen sind allerdings hoch. Die Fluoreszenzintensität des PE scheint sehr variabel zu sein und wird möglicherweise durch verschiedene Faktoren beeinflusst. So konnte bei den vegetativen Zellen, die sich im Grünlicht aus Hormogonien entwickelt hatten, keine derartige Erhöhung der relativen Fluoreszenzintensität beobachtet werden. (siehe Kap. 5.3.1.3). Die Beleuchtung mit rotem Licht führte bei vegetativen Zellen nicht zum Verschwinden der PE-Fluoreszenz und hatte auch keine Auswirkungen auf die Lage des Hauptmaximums des Spektrums. Das bedeutet, dass die im Lebenszyklus beobachtete Verschiebung des Hauptmaximums von 674 nm bei Hormogonien zu 642/648 nm bei vegetativen Zellen kein Effekt von chromatischer Adaptation ist, sondern auf Veränderungen in der Pigmentzusammensetzung während des Lebenszyklus beruht.

Bei den hellgrünen *Nostoc* unterschieden sich die Fluoreszenzspektren nach Dauerweißlicht, Hell-/Dunkel und Dauergrünlicht ebenfalls nicht voneinander. Das Hauptmaximum lag hier jeweils bei 576 nm, ein zweites kleineres Maximum bei 674 nm. Bei Beleuchtung mit Rotlicht zeigten hellgrüne *Nostoc* dagegen einen deutlichen Effekt (Abb. 5.14). Das Rotlichtspektrum hatte ein Maximum bei 668 nm, im Bereich der PE-Fluoreszenz war kein Signal vorhanden. Damit ähnelt der Kurvenverlauf dem für bewegliche Hormogonien beobachteten. Bei der Auswahl der gemessenen Zellen wurde jedoch darauf geachtet, dass es sich nicht um Hormogonien handelte. Die hier gemessenen Zellen waren zum einen unbeweglich, zum anderen entsprach ihre Morphologie den vegetativen Zellen. Dieses Ergebnis wurde durch Versuche mit isoliertem hellgrünem *Nostoc* bestätigt.

Neben Unterschieden in der Pigmentzusammensetzung zeigen *Nostoc* des hellgrünen und des dunkelgrünen Typs also auch unterschiedliche Reaktionen auf verschiedene Lichtqualitäten. Hellgrüne *Nostoc* führen eine chromatische Adaptation durch: sie senken im Rotlicht den Anteil an PE. Ob gleichzeitig der Anteil an PC erhöht wird, kann mit der hier angewendeten Methode nicht entschieden werden, da nur relative Fluoreszenzintensitäten verglichen werden und sie keine Absolutwerte liefert.

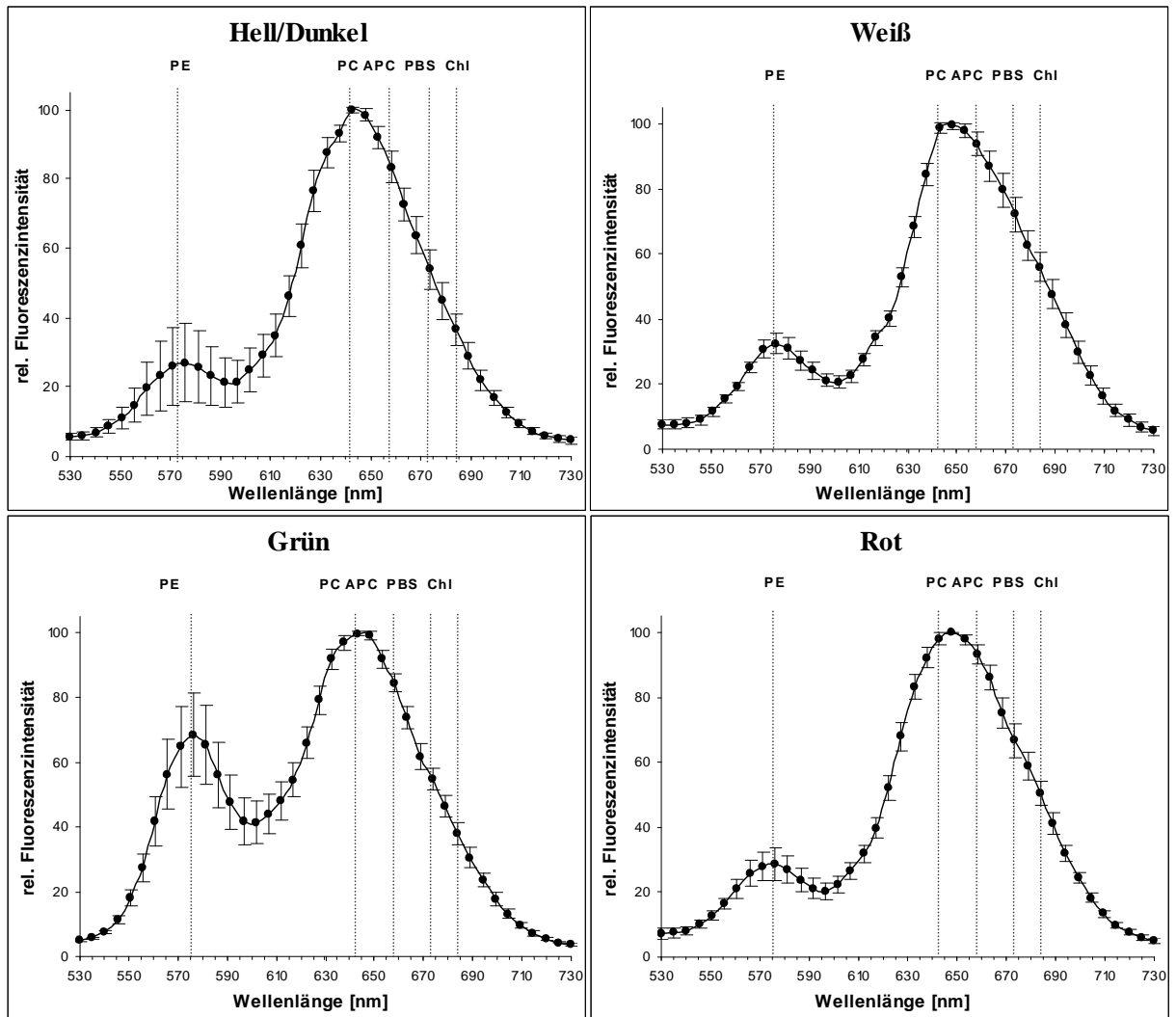


Abb. 5.13: Fluoreszenzspektren freilebender vegetativer dunkelgrüner *Nostoc*-Zellen nach Bestrahlung mit verschiedenen Lichtqualitäten (Hell/Dunkel: $n=8$, Weiß: $n=12$, Rot: $n=8$ und Grün: $n=9$). Die Fluoreszenzmaxima der einzelnen Cyanobakterien-Pigmente sind durch punktierte Linien gekennzeichnet. PE: Phycoerythrin, PC: Phycocyanin, APC: Allophycocyanin, PBS: Phycobilisomen, Chl: Chlorophyll a.

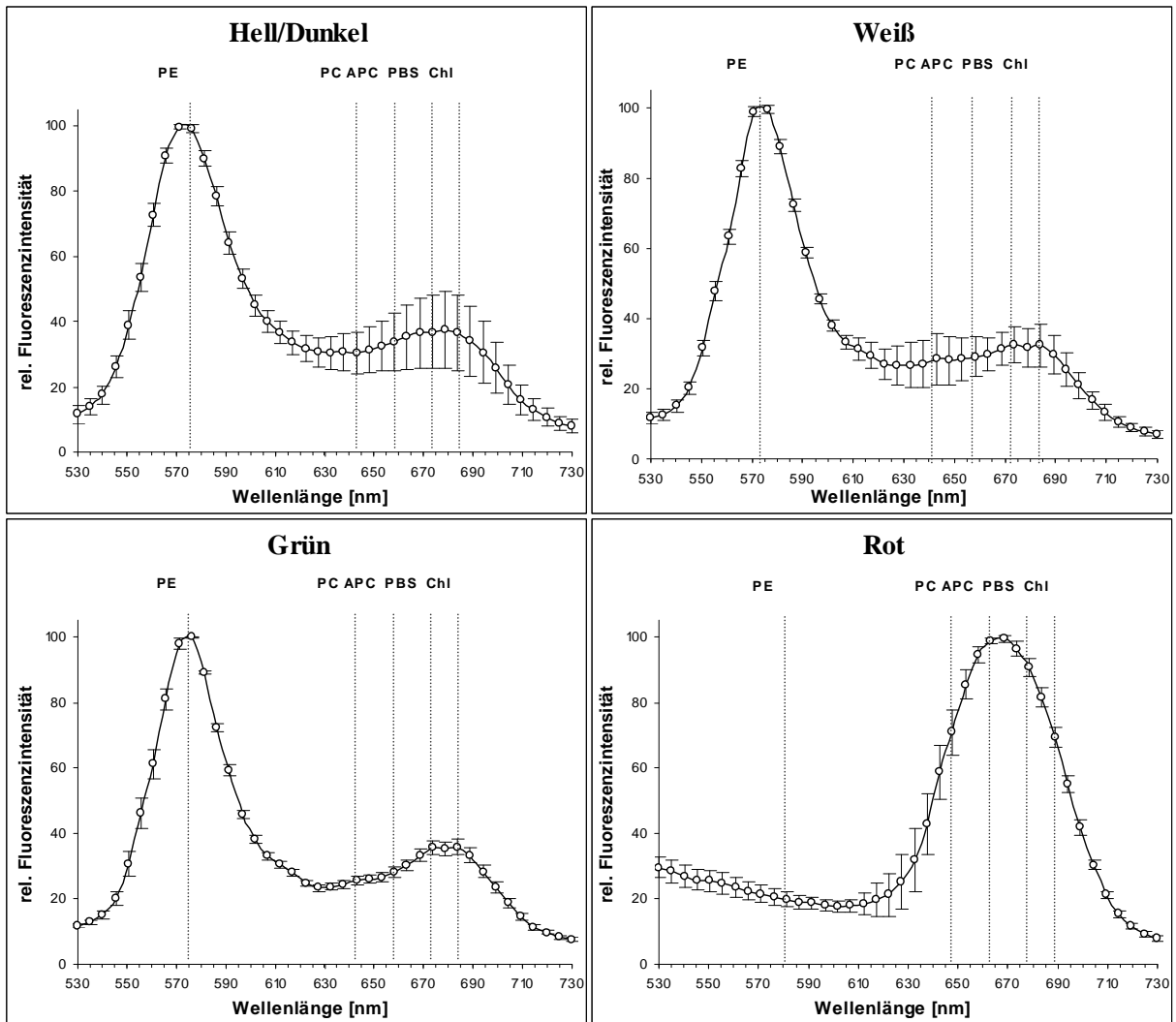


Abb. 5.14: Fluoreszenzspektren freilebender vegetativer hellgrüner *Nostoc* nach Bestrahlung mit verschiedenen Lichtqualitäten (Hell/Dunkel: $n=13$, Weiß: $n=13$, Rot: $n=14$ und Grün: $n=7$). Die Fluoreszenzmaxima der einzelnen Cyanobakterien-Pigmente sind durch punktierte Linien gekennzeichnet. PE: Phycoerythrin, PC: Phycocyanin, APC: Allophycocyanin, PBS: Phycobilisomen, Chl: Chlorophyll a.

5.3.2.3 Ergebnisse der Versuche mit endosymbiotischem *Nostoc* in *Geosiphon*-Blasen

Die Fluoreszenzspektren von *Nostoc* in dunkelgrünen *Geosiphon*-Blasen entsprachen denen der vegetativen freilebenden dunkelgrünen *Nostoc*-Zellen. Das Hauptmaximum lag bei allen Lichtqualitäten zwischen 643 nm und 648 nm. Die relativen Fluoreszenzintensitäten der PE Peaks in der Symbiose entsprachen bei allen untersuchten Lichtqualitäten dem bei freilebendem *Nostoc* im Grünlicht beobachteten Fluoreszenzanteil, allerdings ebenfalls mit relativ hohen Standardabweichungen.

Die hellgrünen *Nostoc*-Zellen zeigten erstaunlicherweise in der Symbiose wie *Nostoc* in dunkelgrünen Blasen keine Reaktion auf die Beleuchtung mit Rotlicht. Das Hauptfluoreszenzmaximum der *Nostoc*-Zellen innerhalb hellgrüner Blasen lag bei allen untersuchten Lichtqualitäten bei 576 nm, die Pigmentfluoreszenzen für PC, APC und Chl waren wie bei freilebendem hellgrünem *Nostoc* in weißem und grünem Licht sehr gering.

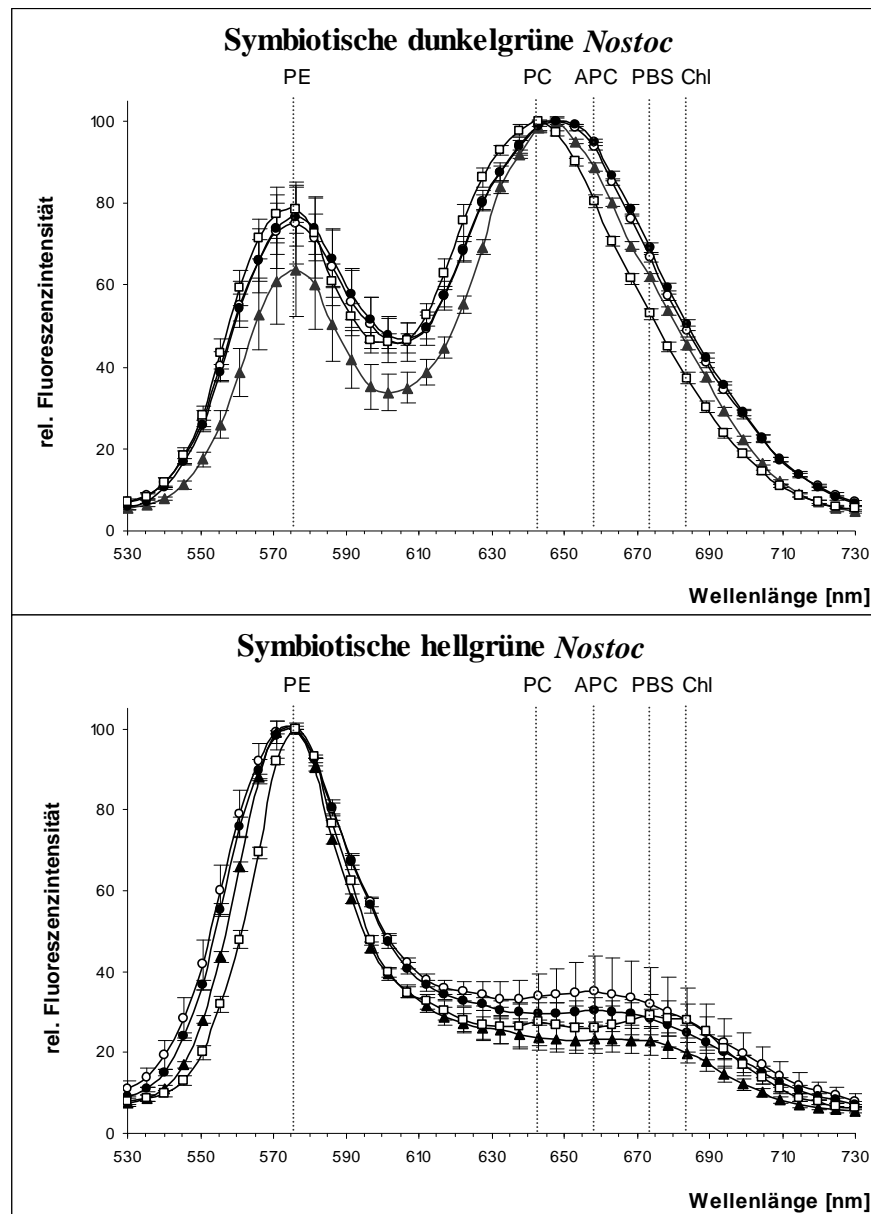


Abb. 5.15: Fluoreszenzspektren symbiotischer *Nostoc*-Zellen in dunkelgrünen und in hellgrünen *Geosiphon*-Blasen (\square : Hell/Dunkel, \circ : Weiß, \blacksquare : Grün, \blacktriangle : Rot; jeweils $n=18$). Die Fluoreszenzmaxima der einzelnen Cyanobakterien-Pigmente sind durch punktierte Linien gekennzeichnet. PE: Phycoerythrin, PC: Phycocyanin, APC: Allophycocyanin, PBS: Phycobilisomen, Chl: Chlorophyll a.

5.3.3 Anteile der einzelnen Pigmentfluoreszenzen am Überlagerungsspektrum

5.3.3.1 Einführung

Die Absorptions- und Emissionseigenschaften isolierter Phycobiliproteine sind bei verschiedenen Cyanobakterien untersucht worden (siehe Tab. 5.1 und Tab. 5.2., Gray & Gantt 1975, Bryant 1982, Glazer 1987). Auch isolierte Komplexe, ganze Phycobilisomen oder Teile davon, sowie künstliche Konjugate aus 2 oder 3 Phycobiliproteinen wurden auf ihre spektralen Eigenschaften im Hinblick auf Energieübertragungsvorgänge untersucht (Wang et al., 1997; Zhao et al., 1999). Über die Fluoreszenzspektren des gesamten Proteinkomplexes in der lebenden Zelle ist jedoch sehr wenig bekannt (Mohanty, 1972; Peterson et al., 1981). Die in Tab. 5.1 dargestellten Fluoreszenzmaxima der gereinigten Proteine stimmen gut mit den in der vorliegenden Arbeit gemessenen Maxima und Schultern der lebenden Zellen überein. Allerdings treten in den gemessenen Spektren auch Maxima auf, die nicht allein auf ein spezielles Pigment zurückzuführen sind. Diese Maxima können durch Überlagerung von Fluoreszenzen mehrerer am Komplex beteiligter Proteine entstehen, wenn kein vollständiger Energietransfer zwischen den Phycobiliproteinen vorliegt (Wang et al., 1997; Zhao et al., 1999). Das Auftreten von Fluoreszenz-Peaks der im energiereicheren Bereich des Spektrums absorbierenden Proteine der Energieflussskette ist bei spektrophotometrischen Messungen nur bei dissoziierten Phycobilisomen beobachtet worden (Wang et al., 1997; Zhao et al., 1999). Da die vorliegenden Messungen an lebenden Zellen mit intaktem Photosynthese-Apparat vorgenommen wurden, beruht die Fluoreszenzabstrahlung aller Pigmente wahrscheinlich auf einer Sättigung der Absorptionszentren aufgrund der hohen eingestrahlten Lichtintensität durch die Laser-Anregung (siehe Energieberechnung im Anhang 8.2). Um theoretisch zu überprüfen, ob die gemessenen Maxima tatsächlich aus Überlagerungen von Fluoreszenzen der einzelnen beteiligten Pigmente entstehen können, wurden mittels nichtlinearer Regression solche Überlagerungen berechnet.

5.3.3.2 Ergebnisse

Die aus den Fluoreszenzspektren isolierter Phycobiliproteine und Chlorophyll a berechneten Bestkurven erreichen eine gute Übereinstimmung mit den gemessenen Fluoreszenzspektren (Abb. 5.16). In Tab. 5.4 sind die berechneten Anteile der Einzelkurven an den in Abb. 5.16 gezeigten Bestkurven für charakteristische Fluoreszenzspektren aufgeführt und in Abb. 5.17 im Verhältnis zu den Bestkurven grafisch dargestellt. Für vegetative dunkelgrüne *Nostoc* wurde durch die Überlagerung der Fluoreszenzspektren von PC, APC und Chl in Anteilen von 30,9%, 20,5% und 12,5% ein Maximum bei 658 nm ermittelt, was gut mit dem

tatsächlich gemessenen Maximum von 653 nm übereinstimmt. Auch der Peak bei 576 nm erreicht in der Berechnung mit einem Anteil von 21,6% eine gute Annäherung an das gemessene Spektrum. Im Bereich von 602 nm bis 617 nm und im Bereich des PC-Maximums bei 643 nm tritt eine etwas größere Abweichung zwischen der berechneten Bestkurve und der gemessenen Kurve auf. Dies beruht eventuell auf Unterschieden zwischen den Fluoreszenzspektren von Pigmenten lebender *Nostoc*-Zellen und denen von isolierten Phycobiliproteinen aus verschiedenen Organismen.

Die gleichen Ergebnisse mit ähnlichen, geringen Abweichungen erhält man für das Spektrum der dunkelgrünen *Geosiphon*-Blasen. Die Berechnung der Bestkurve für das Hormogonien-spektrum ergab mit einem Maximum bei 674 nm und einer Schulter bei 684 nm eine sehr gute Übereinstimmung mit dem tatsächlich gemessenen Spektrum. Die bei der Berechnung ermittelten Anteile der Kurven der Einzelspektren zeigen, dass das Maximum bei 674 nm aus einer Überlagerung der Fluoreszenzspektren von PC, APC und Chlorophyll im Verhältnis von etwa 1:2:4,4 entsteht, während die Fluoreszenz von PE keine Rolle spielt.

Genau umgekehrt verhält sich das Spektrum der hellgrünen *Nostoc*, hier macht PE mit 63,4% den weitaus größten Anteil aus, die Anteile von PC, APC und Chl sind relativ dazu sehr gering. Besonders auffällig ist hier die fast völlig fehlende Chlorophyll-Fluoreszenz (siehe Tab. 5.4). Möglicherweise ist der Anteil an Chlorophyll und den Photosystemen I und II hier erhöht, so dass es zu einer effektiveren Energieausnutzung kommt.

Tab. 5.4: Prozentuale Anteile der Fluoreszenzspektren der einzelnen Pigmente an den berechneten Bestkurven für die Fluoreszenzspektren beweglicher Hormogonien, vegetativer dunkel- und hellgrüner *Nostoc* und dunkelgrüner *Geosiphon*-Blasen (Hormogonien direkt nach Rotlicht und nach 1 Stunde Grünlicht, andere nach 24 Stunden bis 14 Tagen Grünlicht). Dabei ist jeweils die Summe aus den Anteilen der Pigmentfluoreszenzen (PE, PC, APC, Chl) und dem Anteil der Korrekturkurve (BG) gleich 100% gesetzt. Die beiden höchsten Werte sind jeweils fett gedruckt.

Pigment	Hormogonien (0h+1h Gl.)	Dunkelgrüne <i>Nostoc</i> (\geq 1d Gl.)	<i>Geosiphon</i> (\geq 1d Gl.)	Hellgrüne <i>Nostoc</i> (\geq 1d Gl.)
PE	2.47 \pm 1.42	21.65 \pm 1.15	28.98 \pm 1.05	63.36 \pm 1.86
PC	11.53 \pm 1.46	30.91 \pm 1.19	29.19 \pm 1.08	5.15 \pm 1.92
APC	23.05 \pm 1.87	20.49 \pm 1.52	16.48 \pm 1.39	2.84 \pm 2.46
Chl	50.67 \pm 1.28	12.52 \pm 1.04	9.07 \pm 0.95	0.00 \pm 1.68
BG	12.28 \pm 3.57	14.44 \pm 2.91	16.28 \pm 2.65	28.66 \pm 4.71

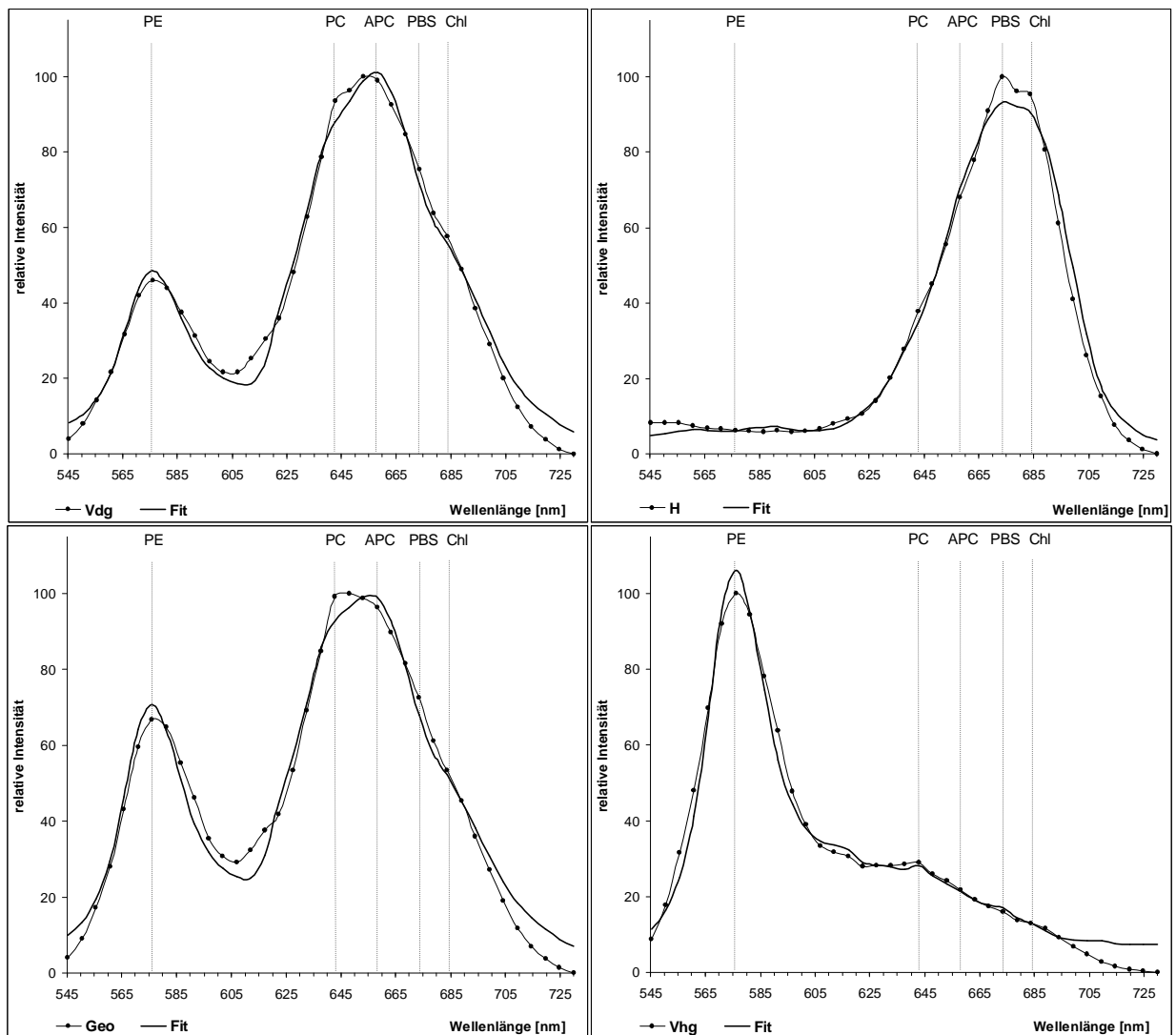


Abb. 5.16: Aus den Einzelspektren der Phycobiliproteine und Chlorophyll a berechnete Bestkurven zu den an lebenden Zellen gemessenen Überlagerungsspektren. Gemessene Spektren: Vdg: vegetative dunkelgrüne *Nostoc*, H: Hormogonien, Geo: endosymbiotische *Nostoc* in dunkelgrünen *Geosiphon*-Blasen, Vhg: vegetative hellgrüne *Nostoc*. Fit: jeweils berechnete Bestkurve. Die Fluoreszenzmaxima der einzelnen Cyanobakterien-Pigmente sind durch punktierte Linien gekennzeichnet. PE: Phycoerythrin, PC: Phycocyanin, APC: Allophycocyanin, PBS: Phycobilisomen, Chl: Chlorophyll a.

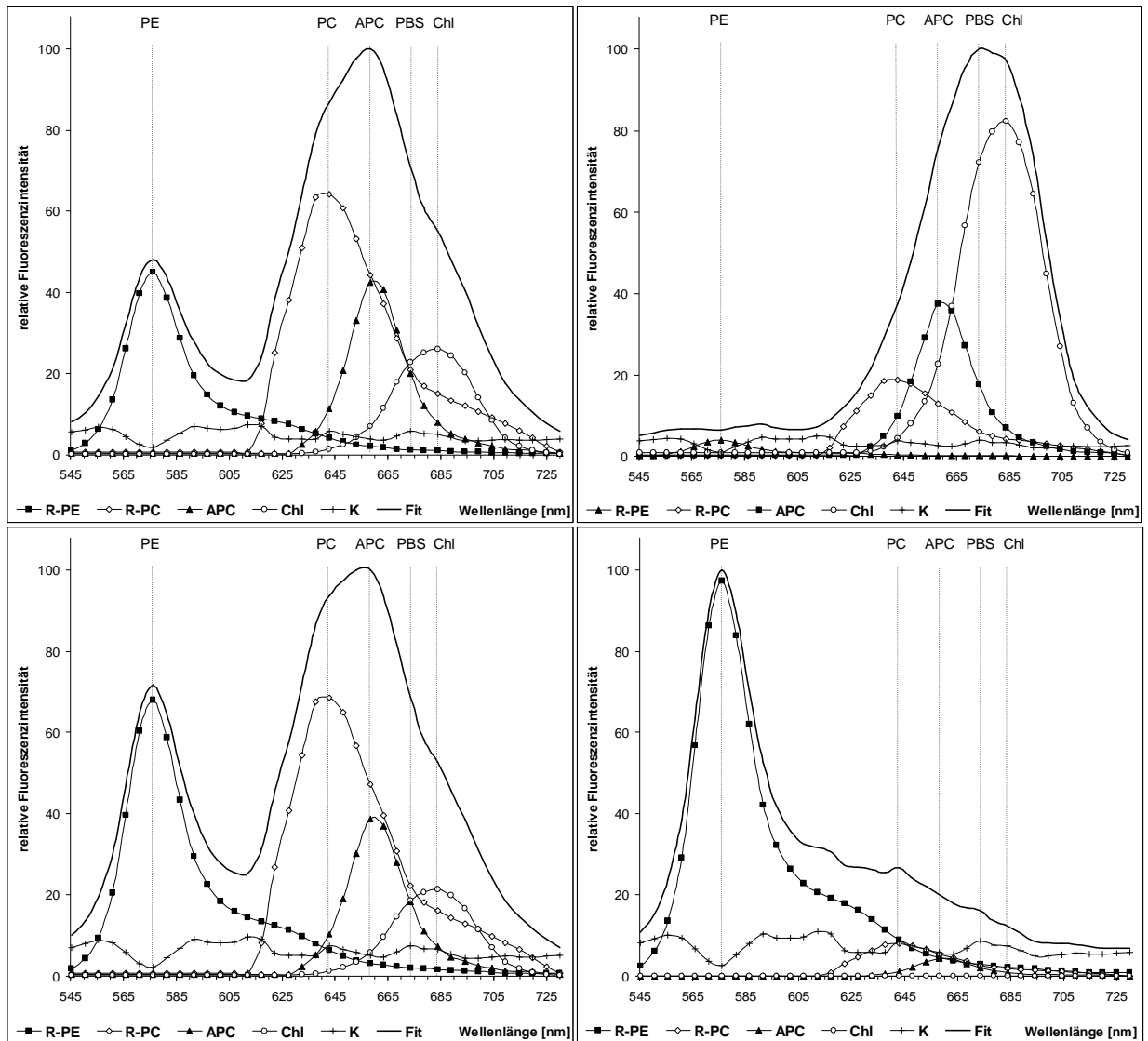


Abb. 5.17: Anteile der Referenzspektren an den berechneten Bestkurven. **A:** vegetative dunkelgrüne *Nostoc*, **B:** Hormogonien, **C:** endosymbiotische *Nostoc* in dunkelgrünen *Geosiphon*-Blasen, **D:** vegetative hellgrüne *Nostoc*; Fit: jeweils berechnete Bestkurve. Die Fluoreszenzmaxima der einzelnen Cyanobakterien-Pigmente sind durch punktierte Linien gekennzeichnet. PE: Phycoerythrin, PC: Phycocyanin. APC: Allophycocyanin, PBS: Phycobilisomen, Chl: Chlorophyll a.

Für Fluoreszenzspektren der Übergangsstadien von Hormogonien zu vegetativen Zellen wurden ebenfalls Bestkurven berechnet. Wie schon in Abb. 5.9 gezeigt, treten beim Übergang von Hormogonien zu vegetativen Stadien variable Spektren auf. Für die Berechnung von Überlagerungskurven wurden daher Mittelwerte, gemittelt über einen Zeitbereich von 2 Stunden, verwendet. Anhand der Berechnungen kann gezeigt werden, dass mit zunehmender Zeitdauer der Bestrahlung mit Grünlicht (d.h. Differenzierung zu Primordien) der Anteil der PE-Fluoreszenz ansteigt (Abb. 5.18). Die PC-Fluoreszenz ist bei beweglichen Hormogonien geringer als bei den folgenden Stadien, bei denen sie dann auf etwa gleichem Niveau bleibt. Bei der APC-Fluoreszenz lässt sich keine Tendenz ausmachen, während der Anteil der Chlorophyll-Fluoreszenz am Gesamtspektrum mit der Differenzierung der Zellen deutlich fällt.

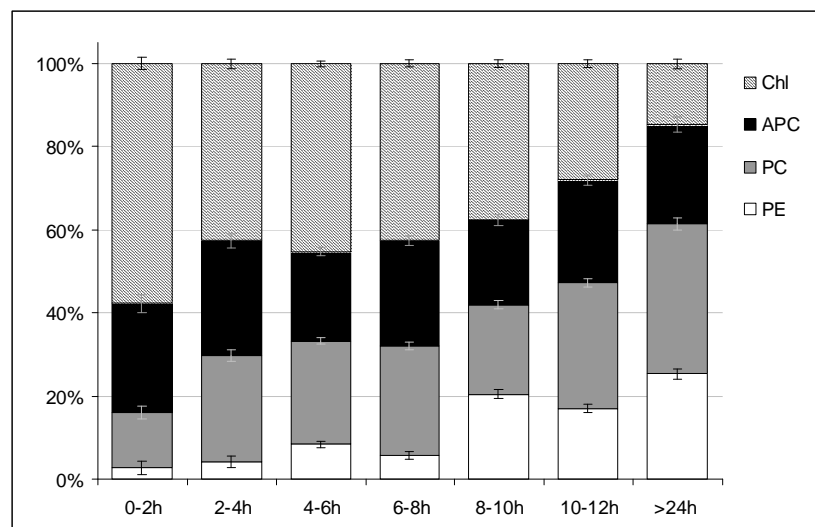


Abb. 5.18: Anteile der einzelnen Pigment-Fluoreszenzspektren bei beweglichen Hormogonien (0 bis 2 Stunden, n=19), vegetativen Zellen (>24 Stunden, n=68) und Übergangsstadien zwischen 2 und 12 Stunden (2 bis 4 Stunden: n=69, 4 bis 6 Stunden: n=54, 6 bis 8 Stunden: n=46, 8 bis 10 Stunden: n=28, 10 bis 12 Stunden: n=67) im Grünlicht.

5.4 DISKUSSION

5.4.1 Methodik

Durch die Verwendung des CLSM können Fluoreszenzspektren sowohl einzelner Zellen und Zellverbände als auch intrazellulärer Bereiche bei lebenden Organismen gemessen werden. Für die Erstellung eines Spektrums sind mehrfache (hier 40) aufeinander folgende Scans erforderlich. Daher ist es wichtig, bei der Messung eine möglichst niedrige Anregungsenergie zu wählen, um phototoxische Prozesse und ein zu starkes Ausbleichen der Pigmente während der Detektion zu vermeiden. Um trotz der niedrigen Anregungsenergie eine möglichst hohe Signalausbeute zu erhalten, wurde das confokale Pinhole des CLSM, das bei der Aufnahme von dreidimensionalen Bildstapeln die Detektion von Fluoreszenzlicht außerhalb der Fokusebene verhindert, komplett geöffnet und das Fluoreszenzsignal in überlappenden Intervallen von 10 nm Bandbreite detektiert. Damit ist die Auflösung der mit dem CLSM ermittelten Fluoreszenzspektren im Vergleich zu spektroskopischen Messungen zwar etwas geringer, doch erlaubt die Methode eine sehr genaue Lokalisation der gemessenen Fluoreszenzen selbst innerhalb einer Zelle. Ein Bleichtest zeigte, dass die Fluoreszenzintensität vor allem von PE, aber auch von PC, bereits nach wenigen Scans abnimmt, während die Chlorophyllfluoreszenz sehr stabil bleibt (Abb. 5.2). Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, muss die Detektion daher, beginnend bei 530 nm, um das empfindliche PE-Signal zuerst zu detektieren, bei allen Messungen in der gleichen Richtung erfolgen. Vor Beginn eines Wellenlängenscans müssen mehrere Scans durchgeführt werden, um eine geeignete Scanebene und den Photomultiplier optimal einzustellen. Dadurch wird jeweils unterschiedlich starkes Ausbleichen v.a. des PE ausgelöst, was wahrscheinlich die Ursache für die relativ hohen Standardabweichungen des PE-Fluoreszenzmaximums bei vegetativen und symbiotischen Zellen darstellt.

Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten sind nicht absolut, sondern abhängig von der Höhe der Anregungsenergie, von der Empfindlichkeitseinstellung des Photomultipliers und von der Lage des Objektes im Strahlengang (Optik). Daher treten zwischen verschiedenen Messungen Unterschiede in den absolut gemessenen Intensitätswerten auf. Um qualitative Vergleiche zwischen verschiedenen Messungen anzustellen, wurden alle gemessenen Spektren auf 100% ihres Maximums normiert. Eine quantitative Aussage kann nur innerhalb eines Bildes oder zwischen unmittelbar nacheinander mit unveränderten Einstellungen vorgenommenen Messungen getroffen werden. Ein Vergleich der PMT-Einstellungen (siehe Anhang Abb. 8.1), die jeweils auf das zu messende Filament optimiert wurden, bei sonst unveränderten

Einstellungen während der ersten 12 Stunden der Messung zeigte, dass Hormogonien geringere Fluoreszenzintensitäten haben als spätere Stadien.

5.4.2 Charakterisierung des bisher unbekannten *Nostoc*-Typs

Während der Untersuchungen zu dieser Arbeit trat in den Kulturen ein unbekannter, möglicherweise durch spontane Mutation entstandener *Nostoc*-Typ als Kontamination auf. Zellen dieses Typs können ebenfalls eine *Geosiphon*-Symbiose eingehen. Die daraus entstehenden *Geosiphon*-Blasen haben im Gegensatz zu den bisher aus der Kultur und dem Freiland bekannten dunklen Blasen eine hellgrüne Färbung (Abb. 5.6). Dieser Farbunterschied ist bei den freilebenden Cyanobakterien selbst im Lichtmikroskop nicht oder kaum wahrzunehmen. Durch Messung der Fluoreszenzspektren mit dem CLSM lassen sich die beiden Typen jedoch klar unterscheiden. Zum einen treten Unterschiede in der Lokalisation des maximalen Fluoreszenzsignals in den vegetativen Zellen auf, zum anderen ist durch eindeutige Unterschiede in den Fluoreszenzspektren vegetativer Stadien beider Typen eine zweifelsfreie Zuordnung der *Nostoc*-Filamente möglich. Durch simultane Detektion der Fluoreszenz in drei verschiedenen Wellenlängenbereichen, die sich jeweils über das Fluoreszenzmaximum eines Phycobiliproteins und Chlorophyll erstrecken, lässt sich im CLSM die unterschiedliche Pigmentierung der beiden Stämme der Mischkultur in einem 3-Kanal-Falschfarbenbild farblich darstellen (Abb. 5.7).

Die unterschiedliche Lokalisation des Fluoreszenzmaximums bei vegetativen Zellen der beiden Stämme könnte auf Unterschiede in der Anordnung der Thylakoidmembranen, an welchen die fluoreszierenden Pigmente in den Phycobilisomen assoziiert sind, zurückgehen. Unterschiede in der Organisation der Thylakoidmembranen in der Zelle zwischen verschiedenen Cyanobakterien-Stämmen wurden bereits beschrieben (Gantt, 1994; Stanier, 1988). Solche Unterschiede können aber auch in Abhängigkeit vom physiologischen Zustand auftreten (Stevens & Nierzwicki-Bauer, 1991). Sherman et al. (1994) fanden zudem eine Abhängigkeit der Verteilung von PSI und PSII in den Thylakoidmembranen von der Anordnung der Thylakoide in der Zelle. In Cyanobakterien mit konzentrischen Thylakoiden kommt PSI hauptsächlich in den äußeren Thylakoidmembranen vor, während PSII gleichmäßig in allen Thylakoidmembranen verteilt ist. Bei Cyanobakterien, deren Thylakoide die Zelle radiär durchziehen, wurde keine spezifische Verteilung der Photosysteme festgestellt.

Bei beweglichen Hormogonien wurden weder Unterschiede in der Verteilung der fluoreszierenden Pigmente noch im Verlauf des Fluoreszenzspektrums gefunden. Da es sich bei den untersuchten Cyanobakterien um einen Mischstamm handelte, erschien es zunächst möglich, dass zufällig ausschließlich Hormogonienstadien des dunkelgrünen Typs untersucht wurden, deren maximales Fluoreszenzsignal peripher am Rand der Zellen detektiert wurde.

Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass die fluoreszierenden Pigmente der Hormogonienstadien des hellgrünen Stammes ebenso wie die der dunkelgrünen *Nostoc* hauptsächlich peripher lokalisiert sind. Spätere Untersuchungen an Hormogonien des isolierten hellgrünen Stammes bestätigten, dass sich die Hormogonien (in weißem Licht durch Zugabe frischen Mediums entstanden) dieses *Nostoc*-Typs weder in ihrem Fluoreszenzspektrum noch in der Lokalisation des Fluoreszenzsignals von denen der dunkelgrünen *Nostoc* unterscheiden.

Von Tandeau de Marsac (1994) wurde eine im Allgemeinen periphere Anordnung der Thylakoide bei Hormogonien im Gegensatz zu eher im Cytoplasma verteilten Thylakoiden vegetativer Zellen festgestellt. Allerdings beschreibt sie für Hormogonien bei *Nostoc* sp. vorwiegend gewunden vorliegende Thylakoidmembranen. Bei einem Vergleich der Fluoreszenzlokalisierung der einzelnen Pigmente fällt auch auf, dass die im Verhältnis zu PE sehr schwachen Fluoreszenzsignale für PC, APC und Chl bei vegetativen Zellen des hellgrünen Stammes, im Gegensatz zu PE, ähnlich wie bei denen des dunkelgrünen Stammes eher im äußeren Bereich der Zellen auftreten (siehe Abb. 5.7). Dies spricht gegen eine unterschiedliche Anordnung der Thylakoide in den verschiedenen *Nostoc*-Stämmen.

Denkbar wäre auch, dass die bei den hellgrünen *Nostoc* auftretende hohe PE-Fluoreszenz dadurch verursacht wird, dass keine intakte Energieflusskette vorliegt. Die Lokalisation der PE-Fluoreszenz im Innern der Zellen könnte einen Hinweis darauf geben, dass PE nicht funktionsfähig in die Phycobilisomen eingebaut werden kann und evtl. gelöst im Cytoplasma vorliegt. Die von PE absorbierte Anregungsenergie könnte dann nicht an die Proteine der Energieflusskette weitergegeben werden, sondern würde zum größten Teil als Fluoreszenz wieder abgestrahlt. Um die Ursachen für die Unterschiede in der Fluoreszenzlokalisierung zwischen den beiden *Nostoc*-Stämmen zu klären, müssen noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

5.4.3 Anteile der einzelnen Pigmentfluoreszenzen am Überlagerungsspektrum

Die publizierten spektroskopisch gemessenen Fluoreszenzspektren intakter Zellen (Mohanty et al., 1972), isolierter PBS (Gantt et al., 1975; Gray & Gantt, 1976) oder künstlicher 'rod-core' Komplexe (Wang et al., 1997; Zhao et al., 1999) zeigen bei Raumtemperatur nur Maxima des Pigments mit der niedrigsten Absorptionsenergie, was bedeutet, dass ein fast vollständiger Energietransfer zwischen den Phycobiliproteinen des Komplexes vorliegt. Bei den Messungen mit dem CLSM zeigen die Fluoreszenzspektren jedoch auch Fluoreszenzmaxima und deutliche Schultern der Phycobiliproteine mit Absorptionsmaxima bei kleineren Wellenlängen, also aus der gesamten Energieübertragungskette. Auch bei den von Peterson et al. (1981) an einzelnen, lebenden Zellen im Mikroskop gemessenen Fluoreszenzspektren (Ex 546nm) treten eine Schulter bei 646 nm und ein Maximum bei

658 nm auf. Da die Fluoreszenzspektren im CLSM an lebenden Cyanobakterien gemessen wurden, ist unwahrscheinlich, dass etwa eine Dissoziation der PBS für die Schultern und zusätzlichen Peaks, die den beteiligten Pigmenten zugeordnet werden können, verantwortlich ist. Es stellt sich die Frage, warum die Energie nicht wie bei den spektroskopischen Messungen bis zum Chlorophyll a weitergegeben wird.

Bilger et al. (1994) ermittelten für freilebende *Nostoc* des Stammes 1:1-26 sowohl für vegetative Stadien als auch für Hormogonien eine Sättigung der Absorptionszentren bei einer PPFD zwischen 100 und 200 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Für die Laseranregung im CLSM ergibt sich aus der Berechnung der Anzahl der Photonen pro Pixel und der Scanzeit ein geschätzter Wert für die PPFD von über 11000 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (siehe Anhang 8.2). Bei dieser hohen Anregungsintensität ist auch bei optimaler Energietransfereffizienz ein vollständiger Energietransfer nicht möglich. Durch die hohe Quantenflussdichte sind dann die Absorptionszentren aller Phycobiliproteine gesättigt und die überschüssige Energie muss als Fluoreszenz (oder auch z.B. als Wärme) abgeführt werden. Dabei könnte es, trotz sehr kurzer Bestrahlungszeit (40 Scans, jeweils 1,95 μs pro Pixel), auch zu einer Photoinhibition und Schädigung des Photosyntheseapparates kommen.

Bei der Messung mit dem CLSM werden also Fluoreszenzsignale aus Komplexen mehrerer fluoreszierender Pigmente detektiert. Das Gesamtspektrum stellt aber, im Gegensatz zu publizierten Messungen mit dem Spektrometer, ein Summenspektrum von Fluoreszenzen der einzelnen Pigmente dar. Die Verhältnisse der an diesem Summenspektrum beteiligten Pigmentfluoreszenzen können durch eine nichtlineare Regressionsberechnung näherungsweise ermittelt werden.

Die trotz der insgesamt sehr guten Repräsentation der gemessenen Spektren durch die Bestkurven auftretenden Abweichungen könnten verschiedene Ursachen haben. Der Kurvenverlauf der gemessenen Spektren ist im Vergleich zu spektroskopischen Messungen durch weniger Messpunkte charakterisiert, zudem erfolgte bei den gemessenen Spektren eine Mittelung des detektierten Fluoreszenzsignals über einen Wellenlängenbereich von 10 nm, um die Signalausbeute zu erhöhen, wodurch eine leichte Verzerrung des Kurvenverlaufs auftreten kann. Dies konnte für die Vergleichsspektren von Molecular Probes ausgeglichen werden, indem auch diese über 10 nm gemittelt wurden. Die Fluoreszenzspektren isolierter Proteine wurden mit einer jeweils auf das Pigment abgestimmten Anregungswellenlänge ermittelt, so dass eine optimale Anregung der Fluoreszenz stattfindet. Bei den Messungen im CLSM wurde zur Fluoreszenzanregung die 488 nm-Linie des ArKr-Lasers verwendet, um über die ganze Bandbreite der Emissionswellenlängen detektieren zu können. Da diese Wellenlänge zur Anregung von Phycobiliproteinen nicht optimal ist, können möglicherweise dadurch schwächere Fluoreszenzintensitäten nicht mehr aufgelöst werden.

Es gibt verschiedene Formen von Phycoerythrinen, Phycocyaninen und Allophycocyaninen, die sich in der Anzahl und Anordnung ihrer Fluorophore unterscheiden und deren Fluoreszenzspektren voneinander abweichen (Zilinskas et al., 1980; Glazer, 1987; Ong & Glazer, 1991). Diese verschiedenen Typen sind in den für die Berechnungen verwendeten Referenzspektren nicht repräsentiert. Im intakten Phycobilisom werden die spektralen Eigenschaften der Phycobiliproteine durch Linker-Polypeptide beeinflusst, die auch selbst Absorptions- und Emissionsbanden besitzen können (Anderson et al., 1983; Grossman et al., 1994; Pizarro & Sauer, 2001). Die Phycobiliproteine verschiedener Cyanobakterien-Stämme zeigen Unterschiede (Schneider et al., 1993; MacColl, 1998) in ihrer Struktur und Absorptionscharakteristik. Dies ist für den hier verwendeten Stamm jedoch nicht untersucht, so dass die verwendeten Vergleichsspektren, die an Phycobiliproteinen anderer Cyanobakterien Stämme gemessen wurden, nur eine Annäherung darstellen. Der durch diese Faktoren verursachte Fehler kann durch eine Korrekturkurve minimiert werden. Die Berechnungen stellen insgesamt eine sehr gute Repräsentation der gemessenen Spektren dar und zeigen, wie diese durch Überlagerung der Fluoreszenzen einzelner Pigmente zustande kommen. Sie erlauben eine realistische Abschätzung der Anteile der einzelnen Pigmentfluoreszenzen am Gesamtspektrum.

5.4.4 Änderung des Fluoreszenzspektrums im Lebenszyklus von *Nostoc*

Die Experimente an dunkelgrünem *Nostoc punctiforme* des Stammes 1:1-26 zeigen auffällige Unterschiede in den Fluoreszenzspektren der verschiedenen Lebensstadien, die eindeutig unabhängig von Effekten chromatischer Adaptation sind. Während das Spektrum der Hormogonien mit einem Maximum bei 674 nm hauptsächlich aus den Fluoreszenzen von Allophycocyanin und Chlorophyll gebildet wird, kommt es im weiteren Verlauf des Lebenszyklus bei *Nostoc*-Filamenten des dunkelgrünen Typs zu einer Verschiebung des Hauptmaximums vom APC/Chlorophyll zur Fluoreszenz von Phycocyanin mit einem Überlagerungsmaximum bei 653 nm bei vegetativen Stadien. Zusätzlich tritt ein zweites Fluoreszenzmaximum bei 576 nm auf, das dem Phycoerythrin zugeordnet werden kann. Die Berechnung der Überlagerungsspektren zeigt, dass über 50% der Fluoreszenz der Hormogonien von Chlorophyll stammt, während im Spektrum vegetativer Zellen die Fluoreszenz von PC mit ca. 30% den Hauptanteil darstellt. Die Spektren der Übergangsstadien variieren sehr stark, sowohl in der Lage ihres Hauptmaximums als auch im Anteil der PE-Fluoreszenz. Die für die Übergangsstadien berechneten Anteile der Fluoreszenzen einzelner Pigmente zeigen deutlich einen Anstieg in der PE-Fluoreszenz und eine Abnahme im Anteil der Chlorophyll-Fluoreszenz am Gesamtspektrum während der Differenzierung der beweglichen Hormogonien zu unbeweglichen Primordien. Die höheren Standardabweichungen des PE-Maximums im Vergleich zu den anderen im Spektrum

auf tretenden Maxima lassen sich durch das schnellere Ausbleichen von PE im Vergleich zu den anderen Pigmenten erklären.

Bei *Calothrix* sp. PCC 7601 wurde nachgewiesen, dass während der Differenzierung von Rotlicht-induzierten Hormogonien die Transkription aller Phycobiliprotein-Gene gestoppt wird (Damerval et al., 1991). Allerdings wurden bereits nach 24 Stunden im Rotlicht bei Hormogonien von *Calothrix* wieder Transkripte der Phycobiliprotein-Gene nachgewiesen. Bei den gemessenen Spektren von beweglichen *Nostoc* Hormogonien konnten dagegen auch nach 36 Stunden im Rotlicht im Überlagerungsspektrum noch kaum Fluoreszenzen von PE oder PC festgestellt werden. Die Fluoreszenz dieser Pigmente stieg jedoch zwischen 3 bis 12 Stunden nach Beginn der Differenzierung zu vegetativen Stadien durch Grünlichtinduktion deutlich an. Die Möglichkeit, dass der besondere Verlauf des Fluoreszenzspektrums der Hormogonien durch einen vollständigen Energietransfer vom PE zum Chl zustande kommt, kann wegen der hohen Anregungsenergie des Lasers wohl ausgeschlossen werden. Auch eine Veränderung der Zusammensetzung der Phycobilisomen durch chromatische Adaptation liegt nicht vor, da vegetative Zellen, die 3 Tage mit Rotlicht bestrahlt wurden, die gleichen Fluoreszenzspektren wie vegetative Zellen aus weißem Licht zeigten. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass auch bei *Nostoc punctiforme* während der Bildung der Hormogonien die Phycobiliproteine reduziert sind und erst bei der Entwicklung zu Primordien und vegetativen Stadien wieder aufgebaut werden.

Das erneute Auftreten von PC und PE im Fluoreszenzspektrum beginnt im gleichen Zeitbereich - nach ca. 3 Stunden Grünlichtinduktion - in dem die Hormogonien beginnen, ihre Bewegungsfähigkeit zu verlieren (siehe Kap. 3.1) und neue Glykokonjugate an der Oberfläche der Filamente auftreten (Schüßler et al., 1997; siehe Kap. 3.2).

5.4.5 Chromatische Adaptation

Um sicherzustellen, dass die beobachteten Veränderungen der Fluoreszenzspektren im Lebenszyklus von *Nostoc* nicht die Folge einer chromatischen Adaptation an die verwendete Beleuchtung ist, wurden Fluoreszenzspektren vegetativer Zellen nach 3-tägiger Dauerbeleuchtung mit rotem, grünem und weißem Licht sowie nach Beleuchtung mit dem für die Kultur verwendeten Hell/Dunkel-Rhythmus gemessen. Vegetative *Nostoc* des dunkelgrünen Stammes zeigten dabei keine Reaktion auf die verschiedenen Lichtqualitäten. *Nostoc* des hellgrünen Stammes führten dagegen eine deutliche chromatische Adaptation durch. Nach Beleuchtung mit Rotlicht trat keine PE-Fluoreszenz mehr auf. Die Spektren der Zellen aus weißem und grünem Licht unterschieden sich dagegen nicht voneinander. Um Unterschiede der Fluoreszenzspektren im Lebenszyklus dieses Stammes zu detektieren, kann die aufeinanderfolgende Beleuchtung mit Rotlicht und Grünlicht zur Synchronisation des Lebenszyklus demnach nicht verwendet werden.

Bei endosymbiotisch lebendem *Nostoc* in dunkelgrünen *Geosiphon*-Blasen änderte sich das Fluoreszenzspektrum wie bei freilebendem dunkelgrünem *Nostoc* nicht durch die Beleuchtung mit verschiedenen Lichtqualitäten. Endosymbiotisch lebende hellgrüne *Nostoc*-Zellen zeigten im Gegensatz zu freilebendem hellgrünem *Nostoc* allerdings ebenfalls keine Veränderung des Fluoreszenzspektrums nach Beleuchtung mit verschiedenen Lichtqualitäten. Möglicherweise ist die Fähigkeit der Cyanobakterien, auf verschiedene Lichtqualitäten zu reagieren, innerhalb der Blasen vermindert. Rotlicht-Beleuchtung führt bei *Nostoc* in der Symbiose nicht zur Bildung von Hormogonien, und sie scheint einen starken Einfluss auf das chromatische Adaptationsverhalten der Cyanobakterien auszuüben.

5.4.6 Fluoreszenzspektren endosymbiotischer *Nostoc*-Zellen

Die Untersuchung der Fluoreszenzspektren endosymbiotischer *Nostoc*-Stadien hat gezeigt, dass sich, entgegen den vorherigen Erwartungen, die Spektren von Zellen während der Inkorporation und von *Nostoc*-Zellen in der etablierten Symbiose qualitativ nicht von denen vegetativer Stadien des freilebenden *Nostoc* unterscheiden. *Nostoc*-Stadien, die vom Pilz erkannt und aufgenommen werden, besitzen bereits wieder die Pigmentausstattung vegetativer Zellen.

Die bei der Messung von Absorptionsspektren des Stammes 29.90 gefundenen Unterschiede in der Pigmentausstattung freilebender und in der Symbiose etablierter Zellen (Mollenhauer und Kluge, unveröffentlichte Ergebnisse) konnten mit diesen Versuchen nicht bestätigt werden. Möglicherweise reagieren die *Nostoc*-Zellen des Stammes 29.90 anders auf das Leben in Symbiose als der hier untersuchte, ursprünglich aus *Geosiphon* isolierte *Nostoc*-Stamm 1:1-26.

Wie die hier vorgelegte Untersuchung an *Geosiphon* gezeigt hat, eignet sich die Methode der Messung von Fluoreszenzspektren mit dem CLSM sehr gut zur Analyse von Fluoreszenzspektren an lebenden Organismen. In der Phase der Synchronisation der *Nostoc*-Filamente, in welcher erste Erkennungsstadien zwischen *Nostoc* und *Geosiphon*-Hyphen auftreten, liegen die *Nostoc*-Filamente in einer Mischung unterschiedlich weit entwickelter Übergangsstadien vor. Die Messung von Fluoreszenzspektren der lebenden *Nostoc*-Filamente ermöglicht hier eine weitere Charakterisierung des erkenntungsfähigen Stadiums bei der Etablierung der *Geosiphon*-Symbiose.

6 Abschließende Diskussion

Die Partnererkennung und der Prozess der Cyanobakterien-Inkorporation bei *Geosiphon pyriformis* wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit mikroskopisch und mit Zucker-Sättigungsexperimenten untersucht. Dazu wurden die methodischen Voraussetzungen ausgearbeitet, die es erlauben, den Inkorporationsprozess gezielt zu induzieren und Entwicklungsvorgänge am lebenden Organismus über einen längeren Zeitraum zu beobachten.

Mit einem Flüssigkultursystem in speziell angefertigten Filtereinsatzkammern lassen sich sowohl freilebende Cyanobakterien als auch *Geosiphon*-Blasen über einen Zeitraum von 2 bis 3 Wochen kultivieren und mikroskopisch mit sehr hoher optischer Qualität, auch in 3D, beobachten. Das System ist für Manipulationen wie den Wechsel des Mediums, die Zugabe von Farbstoffen oder Änderung der Beleuchtung leicht zugänglich.

Durch das hier beschriebene Beleuchtungsprogramm mit Rot- und Grünlicht kann der Lebenszyklus der Cyanobakterien für eine begrenzte Zeit synchronisiert werden. Dadurch wurde es möglich, das zur Erkennung fähige *Nostoc*-Stadium gezielt zu induzieren. In Gegenwart wachsender *Geosiphon*-Hyphen sind so die Voraussetzungen für eine Untersuchung der Partnererkennung gegeben. Mit dieser Methodik konnten erstmals die Bedingungen für eine Partnererkennung und die darauf folgende Inkorporation gezielt induziert und der Prozess im Detail untersucht werden.

Confokale Laser Scanning Mikroskopie erlaubte die Beobachtung und Dokumentation der *Geosiphon*-Entwicklung über einen Zeitraum von 2 Wochen. Der Prozess der Inkorporation dauert etwa 1,5 bis 2 Tage, in den folgenden 2,5 bis 3,5 Tagen bildet sich aus der Pilzhyphe mit den eingeschlossenen *Nostoc*-Zellen eine kugelförmige junge *Geosiphon*-Blase. Durch die confokale Technik lassen sich mikroskopische Details beobachten, die der konventionellen Lichtmikroskopie verschlossen bleiben. Zu Beginn der Inkorporation wurde bereits in früheren Studien ein Ausbleichen der *Nostoc*-Zellen beobachtet. Die CLSM-Beobachtungen zeigten, dass hier starke Deformationen der *Nostoc*-Zellen auftreten und die Pigment-Fluoreszenz teilweise verloren geht. Die *Nostoc*-Zellen sind während der Inkorporation großem Stress ausgesetzt, den einige Zellen nicht überleben. Innerhalb von 1 bis 2 Tagen regenerieren sich die *Nostoc*-Zellen jedoch wieder und passen sich ihrer neuen Umgebung an.

An 3D-Bildstapeln konnte gezeigt werden, dass die symbiotisch lebenden Zellen nicht nur etwa das 6-fache Volumen der freilebenden *Nostoc* erreichen (Schüßler et al., 1996), sondern auch eine 3- bis 4-mal höhere Zellteilungsrate aufweisen. Die endosymbiotischen Cyanobakterien erreichen so innerhalb der ersten Woche in der Symbiose eine über 30-fach höhere Biomasse als die freilebenden *Nostoc*-Zellen. Dies könnte auf einen Vorteil für die Cyanobakterien in der Symbiose hindeuten, denn die Cyanobakterien zeigen in der Symbiose

- unter den nährstoffarmen Bedingungen (v.a. Phosphat-Mangel), die eine Voraussetzung für die erfolgreiche Etablierung der Symbiose sind - ein deutlich besseres Wachstum.

Das Symbiose-kompetente *Nostoc*-Stadium konnte mit der Methode der Rot-Grün-Synchronisation und konventioneller Lichtmikroskopie sowie CLSM eingegrenzt und charakterisiert werden. Erste mikroskopisch sichtbare Inkorporations-Strukturen des Pilzes traten ab 8 bis 9 Stunden im Grünlicht auf. CLSM-Studien zeigten, dass die vom Pilz erkannten Filamente auch in sehr frühen Inkorporationsstadien bereits durch das Lektin ConA an ihrer Oberfläche markiert werden. Die Zusammensetzung der äußeren Glykokonjugathülle war also zum Beginn der Erkennbarkeit bereits verändert. Die (noch hypothetische) erste Erkennung zwischen den Symbiosepartnern kann also bereits direkt nach dem Verlust der Bewegungsfähigkeit der Hormogonien (nach etwa 4 bis 8 Stunden Grünlicht) stattfinden.

Die Analyse von Fluoreszenzspektren mit spektraler CLSM ergab, dass sich das Fluoreszenzspektrum des hier untersuchten *Nostoc*-Stammes im Verlauf des Lebenszyklus ändert. Mit der hier verwendeten Methode der Bestkurven-Berechnung lassen sich die Anteile einzelner Pigmentfluoreszenzen an einem gemessenen Überlagerungsspektrum realistisch abschätzen. So konnte gezeigt werden, dass die Verschiebung des Fluoreszenzmaximums von 674 nm bei Hormogonien zu 653 nm bei Primordien und vegetativen Stadien auf die Abnahme des Anteils der Chlorophyll-Fluoreszenz und Zunahme des Anteils der Phycocyanin-Fluoreszenz zurückzuführen ist. Beim Übergang vom Hormogonien- zum Primordien-Stadium tritt ein zweites Maximum bei 576 nm auf, welches durch den steigenden Anteil an Phycoerythrin-Fluoreszenz verursacht wird. Die Unterschiede in den Fluoreszenzspektren der verschiedenen Lebensstadien sind nicht auf eine chromatische Adaptation an die verwendete Beleuchtung zurückzuführen, sondern beruhen wahrscheinlich auf dem von Damerval et al. (1994) für *Calothrix* gezeigten Abbau der Phycobiliproteine bei Bildung von Hormogonien. Das Fluoreszenzspektrum von *Nostoc*-Filamenten in frühen Inkorporationsstadien sowie in der etablierten Symbiose unterscheidet sich nicht von dem freilebender vegetativer Zellen. Das für den Pilz erkennbare *Nostoc*-Stadium besitzt also bereits wieder das charakteristische Fluoreszenzspektrum vegetativer Zellen. Diese Eigenschaft kann, wie auch die ConA-Markierung und der Verlust der Bewegungsfähigkeit, als Marker für die Identifikation früher Symbiose-kompetenter *Nostoc*-Stadien genutzt werden. In Abb. 6.1 sind die Charakteristika des vom Pilz erkannten *Nostoc*-Stadiums, der Zeitpunkt der ersten Ausbildung von Pilzstrukturen sowie der noch hypothetische Zeitpunkt der ersten Erkennung grafisch dargestellt.

Charakteristika der Partnererkennung bei *Geosiphon pyriformis*

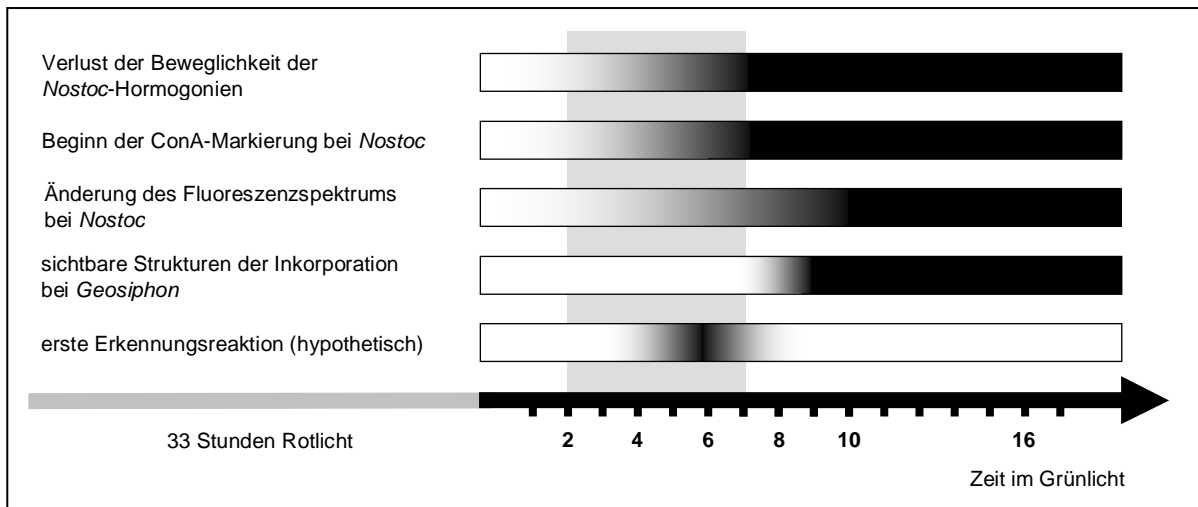


Abb. 6.1: Übersicht über das Auftreten der charakteristischen Merkmale zur Partnererkennung bei *Geosiphon pyriformis*. Mit dem Übergang der *Nostoc*-Filamente vom Hormogonien- zum Primordien-Stadium finden im Zeitbereich zwischen 2 und 7 Stunden (grau unterlegt) spezifische Veränderungen statt (zeitlicher Ablauf jeweils durch Balken markiert), die den Beginn des erkenntungsfähigen *Nostoc*-Stadiums kennzeichnen. In dieser Zeit verlieren die *Nostoc*-Filamente ihre Bewegungsfähigkeit, bilden ein neues durch ConA anfärbares Glykokonjugat in ihrer äußeren Hülle und ändern die Zusammensetzung ihrer Photosynthese-Pigmente. Da erste sichtbare Inkorporationsstrukturen ab 8-9 Stunden nach Beginn der Grünlichtbeleuchtung auftreten, findet die erste, noch hypothetische Erkennungsreaktion zwischen den Symbiosepartnern etwa zwischen 4 und 8 Stunden statt.

Durch die Analyse der Fluoreszenzspektren ist es auch gelungen, eine in der Kultur aufgetretene *Nostoc*-Variante, die möglicherweise durch Mutation entstanden ist, zu charakterisieren. Sie führt zur Bildung von hellgrünen anstelle der bekannten dunklen *Geosiphon*-Blasen. Die bisher unbekannte *Nostoc*-Variante ist mikroskopisch in der Mischkultur nur anhand ihres Fluoreszenzspektrums mit dem Hauptmaximum bei der PE-Fluoreszenz und der Lokalisation des Fluoreszenzsignals innerhalb der vegetativen Zellen von dem ursprünglichen *Nostoc*-Stamm zu unterscheiden. Ob möglicherweise PE hier gelöst im Cytoplasma vorliegt, muss in weiterführenden Studien geklärt werden.

Die Partnererkennung bei *Geosiphon pyriformis* beruht auf einem spezifischen, selektierenden Mechanismus, da nur *Nostoc*-Filamente in einem bestimmten Stadium des Lebenszyklus inkorporiert werden und die Symbiose nur mit bestimmten *Nostoc*-Stämmen erfolgreich zustande kommt. Eine Reaktion des Pilzes auf ein kompetentes *Nostoc*-Filament wurde bisher nur bei direktem Kontakt der Symbiosepartner beobachtet. Ein chemotaktisches Verhalten der *Nostoc* oder auch ein Chemotropismus des Pilzes war nicht erkennbar. Die an der Vermittlung der Erkennung beteiligte Substanz(en) ist daher wohl nicht frei löslich, sondern muss in gebundener Form z.B. in der Hülle der *Nostoc*-Zellen oder an der Zellwand des Pilzes vorliegen. Der Mechanismus der Partnererkennung konnte im Rahmen der vorliegenden

Arbeit nur in einer ersten Annäherung durch Sättigungsexperimente und Lektin-Studien untersucht werden. Die Lektin-Studien bestätigten zwar das von Schüßler et al. (1997) gezeigte Auftreten eines Mannose- (oder Glucose-) haltigen Glykokonjugates im Hüllschleim desjenigen *Nostoc*-Stadiums, welches vom Pilz erkannt wird. Sättigungsexperimente mit Mannose und Glucose hatten allerdings weder einen fördernden noch einen hemmenden Effekt auf die Partnererkennung. Das bedeutet, dass wahrscheinlich weder Mannose noch Glucose selbst direkt an der Erkennung beteiligt sind. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Sättigung potentieller Bindungsstellen durch die zugegebenen methylierten Monosaccharide durch Konkurrenz mit dem spezifischen Glykokonjugat, in welchem diese Zucker möglicherweise in geeigneterer Konfiguration vorliegen, verhindert werden könnte. Möglicherweise spielen auch andere Zucker oder Oligosaccharide des Mannose-haltigen Glykokonjugates bei der Erkennung eine Rolle. Eine Reihe weiterer Mono- und Disaccharide hatte in den Sättigungsexperimenten ebenfalls keinen erkennbaren Einfluss auf die Symbioseetablierung.

Eine verringerte Erkennungsrate wurde dagegen bei Zugabe von Galactose (20 mM), Lactose (20 mM, Galactose- β (1,4)-Glucose) und Mucin (in Konzentrationen über 0,04%) zum Medium festgestellt. Mucin ist ein hochmolekulares Glykoprotein mit hohem Anteil an Sialinsäure sowie weiteren unterschiedlich verknüpften Zuckern, darunter auch Galactose. In Studien von Schüßler et al. (1997) wurde beobachtet, dass ein durch das Lektin RCA-120 (*Ricinus communis*-Agglutinin I, Bindungsspezifitäten: Galactose- β (1,4)-N-Acetylglucosamin > Galactose- β (1,4)-N-Acetylglucosamin- β (1,6)-Galactose) anfärbbares Glykokonjugat im Bewegungsschleim der Hormogonien auftritt, im Primordienstadium jedoch nicht. Erste Sättigungsversuche mit Melibiose (Galactose- α (1,6)-Glucose) zeigten keine Hemmung der Erkennung. Dies könnte auf eine Beteiligung von β -1,4 gebundener Galactose, wie sie in Lactose und auch in Mucin vorkommt, hindeuten.

Um endgültig zu klären, wie die Hemmung durch Galactose und Mucin zustande kommt, müssen weitere Sättigungs- und Markierungsexperimente mit Galactose, verschiedenen Galactose-haltigen Disacchariden und Mucin sowie Lektinen mit Spezifitäten für verschiedene Isomere der Galactose durchgeführt werden. Ebenso könnten α - und β -Galactosidase-Verdaus weitere Anhaltspunkte liefern. Eine Analyse der Zusammensetzung der Glykokonjugathülle der zur Erkennung fähigen Primordien-Stadien und Bindungsstudien mit markiertem Schleim an den Pilzhypen sollten ebenfalls weitere Hinweise zur Beteiligung von Glykokonjugaten am Erkennungsmechanismus liefern.

Die ConA-Bindung, die Veränderung der Pigmentfluoreszenz und der Verlust der Bewegungsfähigkeit der Hormogonien kennzeichnen als "Marker" sehr gut das Symbiosekompatible *Nostoc*-Stadium, das nun induziert und erkannt werden kann und weiter untersucht werden sollte. Diese Merkmale korrelieren eng mit dem *Nostoc*-Stadium, das für

den Pilz erkennbar ist, sind aber nicht ursächlich an der Erkennungsreaktion beteiligt. Die Veränderung der Glykokonjugat-Zusammensetzung in der Hülle der Cyanobakterien und die Ergebnisse der Zucker-Sättigungsversuche sprechen für einen bereits von Schüßler et al. (1997) vermuteten Zucker/Lektin-vermittelten Mechanismus der Erkennung.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Methoden und Ergebnisse zeigen, dass *Geosiphon* sehr gut als Modellsystem für Untersuchungen zur Partnererkennung geeignet ist, da diese Symbiose im Vergleich zur arbuskulären Mykorrhiza leicht für mikroskopische Beobachtungen zugänglich ist. Auch zukünftige molekularbiologische Experimente etwa zur Untersuchung von Transportsystemen oder spezifischer Genexpression können bei *Geosiphon* im Gegensatz zur AM-Symbiose leicht durchgeführt werden, da sich die mRNA des Prokaryoten leicht von der des Eukaryoten trennen lässt. Auch Expressionsstudien mit GFP-Konstrukten könnten mit den Möglichkeiten der mikroskopischen *in vivo*-Beobachtung weiterführende Erkenntnisse liefern.

7 Literaturverzeichnis

- Alberte R.S., Wood A.M., Kursar T.A., Guillard R.R.L. (1984) Novel phycoerythrins in marine *Synechococcus* *ssp.* Characterization and evolutionary and ecological implications. *Plant Physiol.* **75**: 732-739.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. (1994) How cells are studied. In: *Molecular Biology of the Cell*, (3. Auflage, Garland Publishing, New York), 139-156.
- Anderson L.K., Rayner M.C., Sweet R.M., Eiserling F.A. (1983) Regulation of *Nostoc* *sp.* phycobilisome structure by light and temperature. *J. Bacteriol.* **155** (3): 1407-1416.
- Bécard G., Taylor L.P., Douds D.D., Pfeffer P.E., Doner L.W. (1995) Flavonoids are not necessary plant signals in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mol. Plant Microbe Int.* **8**: 252-258.
- Bilger W., Büdel B., Mollenhauer R., Mollenhauer D. (1994) Photosynthetic activity of two developmental stages of a *Nostoc* strain (Cyanobacteria) isolated from *Geosiphon pyriformis* (Mycota). *J. Phycol.* **30**: 225-230.
- Bryant D.A. (1982) Phycoerythrocyanin and phycoerythrin: properties and occurrence in cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 835-844.
- Cobley J.G., Miranda R.D. (1993) Mutations affecting chromatic adaptation in the cyanobacterium *Fremyella diplosiphon*. *J. Bacteriol.* **153**: 1486-1492.
- Cohen M.F., Meeks C. (1997) A hormogonium regulating locus, *hrmUA*, of the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* strain ATCC 29133 and its response to an extract of a symbiotic plant partner *Anthoceros punctatus*. *Mol. Plant Microbe Int.* **10** (2): 280-289.
- Conn P.M. (1999) Confocal Microscopy. *Meth. Enzymol.* 307: 3-26.
- Cox G. (1993) Trends in Confocal Microscopy. *Micron* 24: 237-247.
- Cupac S., Gantar M. (1992) Chemical composition and morphological structure of the mucilaginous sheath of the cyanobacterium *Nostoc* D. *Biomed. Lett.* **47**: 133-138.
- Damerval T., Guglielmi G., Houmard J., Tandeau de Marsac N. (1991) Hormogonium differentiation in the cyanobacterium *Calothrix*: a photoregulated developmental process. *Plant Cell* **3**: 191-201.
- De Philippis R., Faraloni C., Margheri M.C., Sili C., Herdman M., Vincenzini M. (2000) Morphological and biochemical characterization of the exocellular investments of polysaccharide-producing *Nostoc* strains from the Pasteur Culture Collection. *World J. Microb. Biot.* **16**: 655-661.
- Díaz C.L., Spaink H.P., Wijffelman C.A., Kijne J.W. (1995) Genomic requirements of *Rhizobium* for nodulation of white clover hairy roots transformed with the pea lectin gene. *Mol. Plant-Microbe Int.* **8**: 348-356.
- Díaz C.L., Melchers L.S., Hooykaas P.J.J., Lugtenberg E.J.J., Kijne J.W. (1989) Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Nature* **338**: 579-581.
- Edwards M.R., MacColl R., Eisele L.E. (1996) Some physical properties of an unusual C-phycoerythrin isolated from a photosynthetic thermophile. *Biochim. Biophys. Acta* **1276**: 64-70.
- Ernst A., Sandmann G., Postius C., Brass S., Kenter U., Böger P. (1992) Cyanobacterial picoplankton from lake Constance. II. Classification of isolates by cell morphology and pigment composition. *Bot. Acta* **105**: 161-167.

- Fischer E. (1992) Neue Lectine: Spezifität und Wechselwirkung mit Tumorzellen. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Gabius H.-J. (2000) Biological information transfer beyond the genetic code: The sugar code. *Naturwissenschaften* **87**: 108–121.
- Gantar M., Kerby N.W., Rowell P. (1993) Colonization of wheat (*Triticum vulgare* L.) by N₂-fixing cyanobacteria: III. The role of a hormogonia-promoting factor. *New Phytol.* **124**: 505-513.
- Gantt E. (1994) Supramolecular membrane organization. In: Bryant D.A. (ed) *The molecular biology of cyanobacteria*. (Kluwer Academic Publishers, The Netherlands), 119-138.
- Gehrig H., Schübler A., Kluge M. (1996) *Geosiphon pyriforme*, a fungus forming endocytobiosis with *Nostoc* (Cyanobacteria), is an ancestral member of the Glomales: evidence by SSU rRNA analysis. *J. Mol. Evol.* **43**: 71-81.
- Glazer A.N. (1987) Phycobilisomes: assembly and attachment. In: Fay P., Van Baalen C. (eds.) *The Cyanobacteria*. (Elsevier Science Publishers B.V.), 69-93.
- Gray B.H., Gantt E. (1975) Spectral properties of phycobilisomes and phycobiliproteins from the blue-green alga *Nostoc* sp. *Photochem. Photobiol.* **21**: 121-128.
- Grossman A.R., Schaefer M.R., Chiang G.G., Collier J.L. (1994) The responses of cyanobacteria to environmental conditions: lights and nutrients. In: Bryant D.A. (ed) *The molecular biology of cyanobacteria*. (Kluwer Academic Publishers, The Netherlands), 641-675.
- Haury J.F., Bogorad L. (1977) Action spectrum for phycobiliprotein synthesis in a chromatically adapting cyanophyte. *Plant. Physiol.* **60**: 835-839.
- Hepperle, D. (1992) Die Entwicklung des Phytoplanktons im Neckar. Diplomarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Hepler P.K., Gunning E.S. (1998) Confocal fluorescence microscopy of plant cells. *Protoplasma* **201**: 121-157.
- Herdman M., Rippka R. (1988) Cellular differentiation: hormogonia and baeocytes. *Meth. Enzym.* **167**: 232-242.
- Hirsch A.M. (1999) Role of lectins (and rhizobial exopolisaccharides) in legume nodulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**:320-326.
- Hirsch A.M., McFall-Ngai M.J (2000) Fundamental concepts in symbiotic interactions: light and dark, day and night, squid and legume. *J. Plant Growth Regul.* **19**: 113-130.
- Hirsch A., Lum M.R., Downie J.A. (2001) What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? *Plant Physiol.* **127**: 1484-1492.
- Hoiczky E., Baumeister W. (1998) The junctional pore complex, a prokaryotic secretion organelle, is the molecular motor underlying gliding motility in cyanobacteria. *Curr. Biol.* **8**: 1161-1168.
- Hoiczky E., Hansel A. (2000) Cyanobacterial cell walls: News from an unusual prokaryotic envelope. *J. Bacteriol.* **182**: 1191-1199.
- Hounsell, E.F. (1994) Physicochemical analyses of oligosaccharide determinants of glycoproteins. *Adv. Carbohyd. Chem. Bioch.* **50**: 311-350.
- Jürgens U.J., Weckesser J. (1985) The fine structure and chemical composition of the cell wall and sheath layers of cyanobacteria. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* **136A**: 41-44.

- Kaltner H., Stierstorfer B. (1998) Animal lectins as cell adhesion molecules. *Acta Anat.* **161**: 162-179.
- Kim S.-H., Kim G.H. (1999) Cell-cell recognition during fertilization in the red alga, *Aglaothamnion oosumiense* (Ceramiaceae, Rhodophyta). *Hydrobiologia* **398/399**: 81-89.
- Kluge M., Mollenhauer D., Wolf E., Schüßler A. (2002) The *Geosiphon* / *Nostoc* Endocytobiosis. In: Rai A.N., Bergman B., Rasmussen U. (eds) *Cyanobacteria in Symbiosis*. (Kluwer Academic Publishers), 19-30.
- Kluge M., Mollenhauer D., Mollenhauer R. (1991) Photosynthetic carbon assimilation in *Geosiphon pyriforme* (Kützinger) F. v. Wettstein, an endosymbiotic association of fungus and cyanobacterium. *Planta* **185**: 311-315.
- Kluge M., Mollenhauer D., Mollenhauer R., Kape R. (1992) *Geosiphon pyriforme*, an endosymbiotic consortium of a fungus and a cyanobacterium (*Nostoc*), fixes nitrogen. *Bot. Acta* **105**: 343-344.
- Kluge M., Mollenhauer D., Mollenhauer R. (1994) *Geosiphon pyriforme* (Kützinger) von Wettstein, a promising system for studying endocyanoses. *Prog. Bot.* **55**: 130-141.
- Kluge M., Gehrig H., Mollenhauer D., Schnepf E., Schüßler A. (1997) News on *Geosiphon pyriforme*, an endocytobiotic consortium of a fungus with a cyanobacterium. In: Schenk H.E.A., Herrman R., Jeon K.W., Müller N.E., Schwemmler W. (eds) *Eukaryotism and symbiosis*. (Springer-Verlag, Berlin Heidelberg), 469-476.
- Knapp E. (1933) Über *Geosiphon pyriformis* Fr. Wettst., eine intrazelluläre Pilz-Algen-Symbiose. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **LI**: 210-216.
- Kresge N., Vacquier V.D., Stout C.D. (2001) The high resolution crystal structure of green abalone sperm lysin: implications for species-specific binding of the egg receptor. *J. Mol. Biol.* **296**: 1225-1234.
- Kützinger F.T. (1849) *Botrydium pyriformis*. In: F.A. Brockhaus (ed.) *Species algarum*. Leipzig, 486.
- Lazaroff N. (1966) Photoinduction and photoreversal of the *Nostocacean* developmental cycle. *J. Phycol.* **2**: 7-17.
- Lazaroff N., Schiff J. (1962) Action spectrum for developmental photoinduction of the blue-green alga *Nostoc muscorum*. *Science* **137**: 603-604.
- Lin K.L., Wang J.T., Fang L.S. (2000) Participation of glycoproteins on zooxanthellal cell walls in the establishment of a symbiotic relationship with the sea anemone, *Aiptasia pulchella*. *Zool. Stud.* **39**: 172-178.
- Lodeiro A.J., López-García S.L., Vázquez T.E.E., Favelukes G. (2000) Stimulation of adhesiveness, infectivity, and competitiveness for nodulation of *Bradyrhizobium japonicum* by its pretreatment with soybean seed lectin. *FEMS Microbiol. Letters* **188**: 177-184.
- Lodeiro A.R., Favelukes G. (1999) Early interactions of *Bradyrhizobium japonicum* and soybean roots: specificity in the process of adsorption. *Soil Biol. Biochem.* **31**: 1405-1411.
- Lönneborg A., Lind L.K., Kalla S.R., Gustafsson P., Öquist G. (1985) Acclimation processes in the light-harvesting system of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* following a light shift from white to red light. *Plant. Physiol.* **78**: 110-114.
- MacColl R. (1998) Cyanobacterial Phycobilisomes. *J. Struct. Biol.* **124**: 311-334.
- Maetz M., Schüßler A., Wallianos A., Traxel K. (1999) Subcellular trace element distribution in *Geosiphon pyriformis*. *Nucl. Instrum. Meth. B* **150**: 200-207.

- Mårtensson S., Levery S.B., Fang T.T., Bendiak B. (1998) Neutral core oligosaccharides of bovine submaxillary mucin. Use of lead tetraacetate in the cold for establishing branch positions. *Eur. J. Biochem.* **258**: 603-622.
- Mehta V.B., Vaidya B.S. (1978) Cellular and extracellular polysaccharides of the blue-green alga *Nostoc*. *J. Exp. Bot.* **29**: 1423-1430.
- Mohanty P., Braun B.Z., Govindjee, Thornber J.P. (1972) Chlorophyll fluorescence characteristics of system I chlorophyll a-protein complex and system II particles at room and liquid nitrogen temperatures. *Plant Cell Physiol.* **13**: 81-91.
- Mollenhauer D. (1988) Weitere Untersuchungen an *Geosiphon pyriforme* - einer Lebensgemeinschaft von Pilz und Blaualge. *Natur und Museum* **118** (10): 289-309.
- Mollenhauer D., Mollenhauer R. (1988) *Geosiphon* cultures ahead. *Endocyt. Cell Res.* **5**: 69-73.
- Mollenhauer D. (1992) *Geosiphon pyriformis*. In: Reisser W. (ed) *Algae and Symbiosis: Plants, Animals, Fungi, Viruses, Interactions explored*. (Biopress, Bristol), 339-351.
- Mollenhauer D., Büdel B., Mollenhauer R. (1994) Approaches to species delimitations in the genus *Nostoc* Vaucher 1803 ex Bornet et Flahault 1888. *Algol. Stud.* **75**: 189-209.
- Mollenhauer D., Mollenhauer R. (1996) *Nostoc* in symbiosis - Taxonomic implications. *Algol. Stud.* **83**: 435-446.
- Mollenhauer D., Mollenhauer R., Kluge M. (1996) Studies on initiation and development of the partner association in *Geosiphon pyriformis* (Kütz.) v. Wettstein, a unique endocytobiotic system of a fungus (Glomales) and the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* (Kütz.) Hariot. *Protoplasma* **193**: 3-9.
- Nomsawai P., Tandeau de Marsac N., Thomas J.C., Tanticharoen M., Cheevadhanarak S. (1999) Light regulation of phycobilisome structure and gene expression in *Spirulina platensis* C1 (*Arthrospira* sp PCC 9438). *Plant Cell Physiol.* **40**: 1194-1202.
- Ohki K., Gantt E., Lipschultz C.A., Ernst M.C. (1985) Constant phycobilisome size in chromatically adapted cells of the cyanobacterium *Tolypothrix tenuis*, and variation in *Nostoc* sp. *Plant Physiol.* **79**: 943-948.
- Olive J., Ajlani G., Astier C., Recouvreur M., Vernotte C. (1997) Ultrastructure and light adaptation of phycobilisome mutants of *Synechocystis* PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta* **1319**: 275-282.
- Ong L.J., Glazer A.N. (1991) Phycoerythrins of marine unicellular cyanobacteria. I. Bilin types and locations and energy transfer pathways in *Synechococcus* ssp. phycoerythrins. *J. Biol. Chem.* **266**: 9515-9527.
- Peterson R.B., Dolan E., Calvert H.E., Ke B. (1981) Energy transfer from phycobiliproteins to photosystem I in vegetative cells and heterocysts of *Anabaena variabilis*. *Biochim. Biophys. Acta* **634**: 237-248.
- Pizarro S.A., Sauer K. (2001) Spectroscopic study of the light-harvesting protein C-phycocyanin associated with colorless linker peptides. *Photochem. Photobiol.* **73**: 556-563.
- Rasmussen U., Johansson C., Bergman B. (1994) Early communication in the *Gunnera-Nostoc* symbiosis: Plant-induced cell differentiation and protein synthesis in the cyanobacterium. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**: 696-702.
- Robinson B.L., Miller J.H. (1970) Photomorphogenesis in the blue-green alga *Nostoc commune* 584. *Phys. Plant.* **23**: 461-472.

- Rüdiger H. (1998) Plant lectins - more than just a tool for glycoscientists. Occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. *Acta Anat.* **161**(1-4): 130-152.
- Schlösser U.G. (1994) Sammlung von Algenkulturen (SAG) at the University of Göttingen, Catalogue of Strains. *Bot. Acta* **107**: 113-186.
- Schneider S., Prenzel C.-J., Brehm G., Gedeck P., Maruti Sai P.S., Gottschalk L., Scheer H. (1993) A comparison of phycocyanins from three different species of cyanobacteria employing resonance-enhanced coherent anti-Stokes Raman spectroscopy. *Photochem. Photobiol.* **57**: 56-62.
- Schnepf E. (1964) Zur Feinstruktur von *Geosiphon pyriforme*. *Arch. Mikrobiol.* **49**: 112-131.
- Schorler B. (1916) Beiträge zur Flora Saxonica. Über eine merkwürdige Alge Sachsens (*Geosiphon pyriforme* (Ktz.) F. v. Wettst.). In: Sitzungsberichte und Abhandlungen der Naturwissenschaftlichen Gesellschaft ISIS, Dresden e.V., 58-61.
- Schüßler A., Mollenhauer D., Schnepf E., Kluge M. (1994) *Geosiphon pyriforme*, an endosymbiotic association of fungus and cyanobacteria: the spore structure resembles that of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Bot. Acta* **107**: 36-45.
- Schüßler A. (1995) Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der Pilz/Blaualgen-Endosymbiose *Geosiphon pyriforme*: Physiologie, Zellbiologie, Taxonomie. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Schüßler A., Meyer T., Gehrig H., Kluge M. (1997) Variations of lectin binding sites in extracellular glycoconjugates during the life cycle of *Nostoc punctiforme*, a potentially endosymbiotic cyanobacterium. *Eur. J. Phycol.* **32**: 233-239.
- Schüssler A., Kluge M. (2001) *Geosiphon pyriforme*, an endocytosymbiosis between fungus and cyanobacteria, and its meaning as a model system for arbuscular mycorrhizal research. In: Hock (ed) *The Mycota IX, Fungal Associations*. (Springer-Verlag Berlin Heidelberg), 151-161.
- Schüßler A., Gehrig H., Schwarzott D., Walker C. (2001a) Analysis of partial Glomales SSU rRNA gene sequences: implications for primer design and phylogeny. *Mycol. Res.* **105**, 5-15.
- Schüßler A., Schwarzott D., Walker C. (2001b) A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* **105**:1413-1421.
- Schüßler A. (2002) Molecular phylogeny, taxonomy, and evolution of *Geosiphon pyriformis* and arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **244**: 75-83.
- Schwarzott D., Walker C., Schüßler A. (2001) *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomerales), is non-monophyletic. *Mol. Phylogenet. Evol.* **21**: 190-197.
- Sharon N., Lis H. (1989) Lectins as cell recognition molecules. *Science* **246**: 227-234.
- Sherman D.M., Troyan T.A., Sherman L.A. (1994) Lokalisation of membrane proteins in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *Plant Physiol.* **106**: 251-262.
- Sidler W.A. (1994) Phycobilisome and phycobiliprotein structure. In: Bryant D.A. (ed) *The molecular biology of cyanobacteria*. (Kluwer Academic Publishers, The Netherlands), 139-216.
- Smith S.E. and Read D.J. (1997) *Mycorrhizal symbiosis*. (2. Auflage, Academic Press, London, UK.)

- Solíís D., Jiménez-Barbero J., Kaltner H., Romero A., Siebert H.-C., von der Lieth C.-W., Gabius H.-J. (2001) Towards Defining the Role of Glycans as Hardware in Information Storage and Transfer: Basic Principles, Experimental Approaches and Recent Progress. *Cells Tissues Organs* **168**: 5-23.
- Stanier G. (1988) Fine structure of cyanobacteria. *Meth. Enzym.* **167**: 157-172.
- Stevens S.E., Nierzwicki-Bauer S. (1991) The cyanobacteria. In: Stolz J.F. (ed) *Structure of phototrophic prokaryotes*. (CRC Press, Inc, Boca Raton), 15-47.
- Tandeau de Marsac N. (1977) Occurrence and nature of chromatic adaptation in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* **130**: 82-91.
- Tandeau de Marsac N. (1994) Differentiation of hormogonia and relationships with other biological processes. In: Bryant D.A. (ed) *The molecular biology of cyanobacteria*. (Kluwer Academic Publishers, The Netherlands), 825-842.
- Van Rhijn P., Goldberg R.B., Hirsch A.M. (1998) *Lotus corniculatus* nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene. *Plant Cell* **10**: 1233-1249.
- von Wettstein F. (1915) *Geosiphon* Fr. Wettst., eine neue, interessante Siphonee. *Österr Bot Z* **65**: 145-156.
- Vogelmann T.C., Scheibe J. (1978) Action spectrum for chromatic adaptation in the blue-green alga *Fremyella diplosiphon*. *Planta* **143**: 233-239.
- Wang G.C., Zhou B.C., Tseng C.K. (1997) Spectroscopic properties of the C-phycocyanin-allophycocyanin conjugate and the isolated phycobilisomes from *Spirulina platensis*. *Photosynthetica* **34**: 57-65.
- Wassarman P.M., Litscher E.S. (2001) Towards the molecular basis of sperm and egg interaction during mammalian fertilization. *Cells Tissues Organs* **168**: 36-45.
- Zhao J., Zhao J., Zhang J., Jiang L. (1999) Phycobilisome from *Anabaena variabilis* Kütz. and its model conjugates. *Photosynthetica* **36**: 163-170.
- Zilinskas B.A., Greenwald L.S., Bailey C.L., Kahn P.C. (1980) Spectral analysis of allophycocyanin I, II, III and B from *Nostoc* sp. phycobilisomes. *Biochim. Biophys. Acta* **592**: 267-276.

8 Anhang

8.1 FLUORESZENZSPEKTREN

Tab. 8.1: Normierte Referenzspektren isolierter Phycobiliproteine und Chlorophyll a zur Berechnung der gemessenen Fluoreszenzspektren. Die Daten für R-PE und APC stammen von Molecular Probes (www.probes.com), Werte für R-PC wurden einer Graphik von Ong und Glazer (1988) in Sidler (1994) entnommen und das Spektrum für Chlorophyll wurde an Chloroplasten des Mooses *Dicranella* sp. am CLSM gemessen. Alle Spektren wurden auf ihr Maximum und auf 1 normiert.

(nm)	R-PE	R-PC	APC	Chl
530	1	1	1	1
535.13	1	1	1	1
540.26	1.1834	1	1	1
545.38	2.56283	1	1	1
550.51	6.28531	1	1	1
555.64	13.8847	1	1	1
560.77	30.0067	1	1	1
565.9	58.3417	1	1	1
571.03	88.6565	1	1	1
576.15	100	1	1	1
581.28	86.2897	1	1	1
586.41	63.7969	1	1	1
591.54	43.2897	1	1	1
596.67	33.1034	1.12045	1	1
601.79	27.0871	2.80112	1	1
606.92	23.3987	5.7423	1	1
612.05	21.14	9.80392	1	1
617.18	19.6726	19.7479	1	1
622.31	18.3135	39.0326	1	1
627.44	16.7381	59.4575	1	1
632.56	14.2351	79.4216	6.04732	1.45103
637.69	11.6904	98.7714	13.6211	2.90206
642.82	9.19757	100	26.568	5.56227
647.95	7.13589	94.7786	48.8655	9.79444
653.08	5.6578	82.8001	77.8484	16.445
658.21	4.63008	68.9788	100	27.4486
663.33	3.91534	57.9218	95.565	44.8609
668.46	3.38261	44.8683	72.4549	68.8029
673.59	2.8966	32.5827	47.1009	87.7872
678.72	2.59098	26.4399	28.6466	96.977
683.85	2.29612	23.522	18.7221	100
688.97	2.03658	20.7578	12.3521	93.5913
694.1	1.79506	18.7614	9.16492	78.2346
699.23	1.55788	16.765	6.73245	54.5345
704.36	1.34248	14.3078	4.93842	32.89
709.49	1.08752	12.0043	3.46969	15.9613
714.62	1	9.39358	2.8987	8.46433
719.74	1	6.47575	2.63942	4.474
724.87	1	3.40434	1.75248	1.9347
730	1	1	1	1

Tab. 8.2: Gemessene Fluoreszenzspektren von Hormogonien, vegetativen dunkelgrünen *Nostoc*, vegetativen hellgrünen *Nostoc* und symbiotischen *Nostoc* in dunkelgrünen *Geosiphon*-Blasen im Grünlicht. Die Mittelwerte beziehen sich auf die Anzahl einzelner Zellen aus mehreren verschiedenen Messungen.

Wellenlänge (nm)	Hormogonien (n=19)	vegetative dunkelgrüne <i>Nostoc</i> (n=68)	vegetative hellgrüne <i>Nostoc</i> (n=74)	Dunkelgrüne <i>Geosiphon</i> Blasen (n=10)
530	13.41 ±3.62	1.13 ±2.02	1.84 ±1.55	0.14 ±0.75
535.13	11.76 ±3.09	1.45 ±1.89	2.63 ±1.78	0.66 ±0.69
540.26	9.42 ±2.79	2.19 ±1.85	4.65 ±2.29	1.80 ±0.81
545.38	8.31 ±2.71	4.06 ±1.69	8.82 ±3.22	4.08 ±0.94
550.51	8.31 ±2.66	8.03 ±1.80	17.79 ±4.64	9.00 ±1.24
555.64	8.19 ±2.73	14.18 ±2.42	31.54 ±5.82	17.19 ±2.04
560.77	7.44 ±2.48	21.58 ±3.66	47.97 ±6.19	27.95 ±3.20
565.9	6.88 ±2.58	31.61 ±5.79	69.88 ±4.88	43.26 ±4.68
571.03	6.58 ±2.47	41.85 ±8.59	91.91 ±3.80	59.66 ±6.26
576.15	6.17 ±2.45	45.94 ±9.62	100.00 ±0.25	66.89 ±6.88
581.28	6.00 ±2.36	44.05 ±9.64	94.45 ±3.28	64.83 ±6.42
586.41	5.92 ±2.12	37.47 ±8.10	78.24 ±4.55	55.43 ±5.19
591.54	6.29 ±2.20	31.28 ±6.49	63.80 ±4.03	46.19 ±3.83
596.67	5.76 ±1.95	24.58 ±4.83	47.80 ±3.23	35.48 ±2.95
601.79	6.02 ±2.02	21.64 ±3.91	38.98 ±3.14	30.77 ±2.34
606.92	6.58 ±1.86	21.64 ±3.24	33.43 ±2.69	29.11 ±2.05
612.05	8.04 ±2.08	25.25 ±3.15	31.80 ±2.23	32.47 ±2.05
617.18	9.24 ±1.88	30.56 ±3.32	30.53 ±2.25	37.55 ±2.11
622.31	10.70 ±2.13	35.88 ±2.95	28.00 ±2.34	41.87 ±2.26
627.44	14.16 ±2.77	48.11 ±3.61	28.11 ±2.98	53.41 ±2.24
632.56	20.04 ±3.04	62.73 ±3.50	28.26 ±3.74	69.22 ±2.53
637.69	27.80 ±4.47	78.72 ±4.04	28.65 ±4.16	84.80 ±2.07
642.82	37.76 ±4.48	93.56 ±5.26	29.02 ±4.57	99.26 ±1.48
647.95	45.08 ±3.79	96.32 ±2.81	25.98 ±4.50	100.00 ±0.89
653.08	55.56 ±4.41	100.00 ±1.25	24.15 ±4.32	98.81 ±2.24
658.21	67.96 ±4.81	98.94 ±2.22	21.88 ±4.37	96.41 ±4.13
663.33	77.73 ±5.45	92.60 ±3.80	19.23 ±4.04	89.88 ±5.85
668.46	90.87 ±4.32	84.78 ±4.56	17.36 ±3.83	81.55 ±6.38
673.59	100.00 ±1.42	75.54 ±5.03	15.91 ±3.84	72.66 ±6.29
678.72	96.07 ±3.38	63.85 ±5.97	13.86 ±3.64	61.13 ±5.63
683.85	95.33 ±4.40	57.66 ±5.62	12.99 ±3.53	53.31 ±5.16
688.97	80.63 ±6.61	49.02 ±5.18	11.50 ±3.31	45.39 ±4.22
694.1	61.21 ±6.90	38.62 ±5.03	9.22 ±2.78	35.95 ±3.55
699.23	41.00 ±5.41	29.09 ±4.67	6.87 ±2.17	27.23 ±2.58
704.36	26.09 ±4.44	20.00 ±3.96	4.74 ±1.69	19.04 ±1.98
709.49	15.29 ±2.99	12.48 ±3.31	2.89 ±1.29	11.88 ±1.23
714.62	7.55 ±2.03	7.21 ±2.69	1.69 ±1.16	7.00 ±0.75
719.74	3.62 ±1.63	3.79 ±2.17	0.90 ±1.01	3.79 ±0.43
724.87	1.23 ±1.31	1.30 ±2.02	0.33 ±1.01	1.35 ±0.23
730	0.00 ±1.04	0.00 ±2.02	0.00 ±0.87	0.00 ±0.27

Tab. 8.3: Fluoreszenzspektren der Übergangsstadien von Hormogonien zu vegetativen dunkelgrünen Zellen im Grünlicht, jeweils über 2 Stunden gemittelt.

(nm)	MW 2-4h (n=69)	MW 4-6 (n=54)h	MW 6-8 (n=46)h	MW 8-10 (n=28)h	MW 10-12h (n=67)
545.38	8.17 ±5.77	8.66 ±5.90	6.81 ±5.92	10.63 ±6.55	5.97 ±7.30
550.51	8.51 ±5.32	10.06 ±6.20	7.34 ±6.16	14.97 ±7.62	9.52 ±10.41
555.64	8.94 ±4.72	11.68 ±7.15	8.66 ±6.65	21.10 ±9.58	14.26 ±14.17
560.77	9.03 ±4.31	13.24 ±9.08	10.01 ±7.52	26.55 ±11.53	19.34 ±18.23
565.90	9.25 ±3.72	15.51 ±12.20	11.52 ±8.50	32.83 ±13.53	25.41 ±22.71
571.03	9.63 ±3.47	17.26 ±14.87	12.69 ±9.15	38.63 ±15.80	31.00 ±26.29
576.15	9.20 ±3.53	16.55 ±14.71	12.55 ±8.96	39.03 ±16.07	32.35 ±26.38
581.28	8.54 ±3.33	15.78 ±14.51	11.63 ±8.29	37.41 ±15.56	30.56 ±24.27
586.41	7.79 ±3.40	13.62 ±11.72	10.41 ±7.23	31.87 ±13.19	26.66 ±20.99
591.54	7.63 ±3.23	12.65 ±10.31	9.21 ±6.18	28.06 ±11.71	22.69 ±17.66
596.67	6.87 ±3.12	10.69 ±8.21	7.96 ±5.29	22.32 ±9.26	18.17 ±13.96
601.79	7.49 ±3.11	10.45 ±7.09	7.83 ±4.69	19.90 ±7.67	16.36 ±11.65
606.92	8.75 ±2.92	11.27 ±6.83	9.13 ±4.18	18.38 ±6.07	16.52 ±9.74
612.05	11.42 ±3.06	14.00 ±7.44	11.98 ±3.87	20.50 ±5.46	19.98 ±8.77
617.18	15.10 ±4.27	17.48 ±8.55	15.78 ±3.96	23.96 ±5.30	24.94 ±7.92
622.31	18.51 ±5.80	20.84 ±9.58	19.50 ±4.58	25.93 ±5.41	29.18 ±7.34
627.44	26.17 ±9.14	29.41 ±12.53	27.69 ±6.69	33.80 ±7.73	40.07 ±7.01
632.56	36.36 ±13.11	38.73 ±15.49	38.76 ±9.62	43.14 ±10.09	53.71 ±7.81
637.69	48.84 ±16.83	50.44 ±18.36	51.99 ±12.37	54.78 ±13.24	68.65 ±8.84
642.82	63.62 ±19.93	63.85 ±20.15	67.26 ±15.61	67.65 ±14.07	82.41 ±9.69
647.95	69.91 ±19.12	69.13 ±19.02	73.56 ±14.56	73.58 ±13.51	88.15 ±9.44
653.08	79.14 ±16.47	78.20 ±16.70	85.05 ±13.61	83.25 ±11.69	95.23 ±8.35
658.21	86.90 ±12.76	86.20 ±13.30	92.13 ±9.68	90.13 ±8.57	100.00 ±5.72
663.33	91.09 ±9.03	91.89 ±9.56	94.45 ±6.08	93.10 ±5.65	99.43 ±4.98
668.46	97.43 ±5.43	97.14 ±8.30	98.73 ±3.89	97.76 ±4.91	97.73 ±6.31
673.59	100.00 ±7.07	100.00 ±9.72	100.00 ±5.23	100.00 ±8.44	93.72 ±9.03
678.72	91.56 ±10.29	95.43 ±12.76	92.73 ±8.39	93.46 ±10.88	83.95 ±11.32
683.85	88.76 ±13.98	94.24 ±16.08	90.29 ±11.25	92.69 ±13.91	78.08 ±13.36
688.97	76.70 ±14.00	85.14 ±16.69	81.38 ±12.66	83.10 ±14.48	68.52 ±13.48
694.10	58.80 ±12.68	71.01 ±15.80	66.91 ±12.58	70.51 ±13.86	55.46 ±12.42
699.23	41.45 ±10.14	53.97 ±13.80	52.71 ±11.13	55.38 ±12.20	42.82 ±10.19
704.36	27.37 ±7.92	37.21 ±10.51	36.52 ±8.76	38.29 ±9.29	29.53 ±8.08
709.49	16.17 ±6.20	22.21 ±7.38	22.54 ±6.43	22.38 ±6.44	17.71 ±5.65
714.62	9.02 ±5.07	13.15 ±5.66	13.41 ±4.97	13.39 ±5.34	10.64 ±4.61
719.74	4.44 ±4.28	7.19 ±4.92	7.19 ±4.05	7.48 ±4.47	5.89 ±3.91
724.87	1.42 ±3.68	2.65 ±4.52	2.53 ±3.34	2.91 ±4.19	2.23 ±3.47
730.00	0.00 ±3.75	0.00 ±3.94	0.00 ±3.03	0.00 ±3.68	0.00 ±3.21

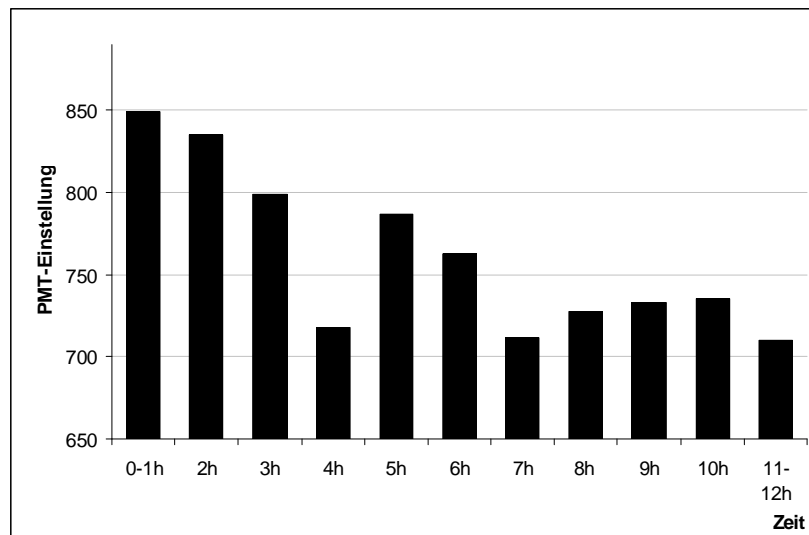


Abb. 8.1: PMT-Einstellungen bei unveränderter Laser-Leistung während der ersten 12 Stunden der Spektren-Messung. In den ersten Stunden nach Beginn der Grünlichtbeleuchtung musste die Sensitivität des PMT kontinuierlich etwas verringert werden, um eine Sättigung des Fluoreszenzsignals zu vermeiden. Eine Auswertung der Fluoreszenzintensität ist bei einer Sättigung (overflow) nicht mehr möglich.

8.2 ABSCHÄTZUNG DER LEISTUNG DES LASERS UND DER PPFD IN DER OBJEKTEBENE

Mit einer in den Strahlengang gehaltenen Photodiode wurde in Höhe des Objektes eine PPFD von 25-30 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ gemessen. Dies gilt für folgende Einstellungen: Laserpower auf ca. "10 Uhr", AOTF 488nm 75%, Strahlteiler RT30/70, 63xH₂O Objektiv, zoom 4, Pinhole komplett geöffnet, low scan speed: 220 Hz. Die auf der Photodiode mit einer Fläche von 1,75 x 1,75 mm² eintreffende Strahlungsmenge wird im Objekt auf einen Pixel, der bei den genannten Einstellungen eine Fläche von 6007,025 nm² einnimmt, fokussiert. Um die Leistung der Strahlung pro Pixel zu berechnen, muss zunächst die Anzahl der pro Pixel eingestrahlt Photonen ermittelt werden.

Für eine gemessene PPFD von 30 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ergibt sich bezogen auf die Fläche der Photodiode ein Wert von $9,19 \cdot 10^{-5} \mu\text{mol Photonen}$, was $5,53 \cdot 10^{-13}$ Photonen pro Pixel pro Sekunde entspricht. Bei unidirektionalem Scan bei 220 Hz ergibt sich für die Pixel dwell time (t_p) von 1,78 μs die Anzahl von $9,85 \cdot 10^7$ Photonen pro Pixel pro dwell time. Die durchschnittliche Energie pro Pixel berechnet sich nach der Formel $E = n \cdot h \cdot c / \lambda$ auf $4,01 \cdot 10^{-8} \text{ mJ}$ (n: Anzahl der Photonen, h: Plancksches Wirkungsquantum, c: Lichtgeschwindigkeit, λ : Wellenlänge). Damit wird pro Pixel bei einer dwell time von 1,78 μs mit $P = E / t_p$ eine Leistung von 0,0225 mW erreicht.

Bilger et al. (1994) bestimmten eine PPFD von 100 bis 200 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ für eine Absättigung aller Absorptionszentren bei freilebenden *Nostoc punctiforme*. Aus der ermittelten Anzahl der Photonen pro Pixel und dwell time ergibt sich eine PPFD von 11684 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Abkürzungen

AOTF	Acusto-Optical Tunable Filter
APC	Allophycocyanin
CLSM	Confokales Laser Scanning Mikroskop
ConA	Concanavalin A
DIC	Differentieller Interferenz-Kontrast
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GM	<i>Geosiphon</i> -Medium
Lac	Lactose
Me-Glc	Methyl- α -D-Glucopyranosid
Me-Man	Methyl- α -D-Mannopyranosid
PC	Phycocyanin
PE	Phycoerythrin
PEC	Phycoerythrocyanin
PMT	Photomultiplier
PPFD	Photosynthetic Photon Flux Density
Rham	Rhamnose
WGA	Wheat Germ Agglutinin

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. M. Kluge danke ich für die Überlassung des Themas, für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Diskussionsbereitschaft und die freien Arbeitsmöglichkeiten in einem ausgesprochen guten Arbeitsklima.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. A. Schüßler, der mich in die *Geosiphon*-Forschung eingeführt hat und von dem ich insbesondere die confokale Laser Scanning Mikroskopie und die 2 Photonen Mikroskopie gelernt habe. Seine theoretische und praktische Anleitung und Hilfsbereitschaft, das Interesse an den Experimenten, viele Diskussionen und unzählige Anregungen haben maßgeblich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. W. Ullrich danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Bei Herrn Prof. Dr. D. Mollenhauer möchte ich mich für die Überlassung vieler *Geosiphon*-Kulturen, an deren Etablierung seine Frau R. Mollenhauer großen Anteil hatte, und die kurzfristig ermöglichten, interessanten Exkursionen zu den wenigen bekannten Standorten von *Geosiphon* im Spessart bedanken.

Für die mathematische Unterstützung bei der Berechnung der Bestkurven zu den Fluoreszenzspektren möchte ich mich bei Herrn Dr. M. Maetz bedanken.

Frau Dr. S. Liebe danke ich für die technische Hilfe bei Problemen mit dem CLSM.

Frau K. Faist danke ich herzlich für viele Stunden Arbeit am Stereomikroskop, ihre zuverlässige technische Unterstützung und ihre integrative und menschliche Art, die maßgeblich zu einem außergewöhnlich guten Arbeitsklima beigetragen hat.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. M. Kluge, Prof. Dr. W. Ullrich und PD Dr. C. Stöhr, danke ich für die Kollegialität und Diskussionsbereitschaft, das angenehme Arbeitsklima und viele hilfreiche Kaffeepausen.

Meinen Eltern möchte ich herzlich für ihr Interesse, ihre Geduld und ihre finanzielle Unterstützung danken.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Wolf
Vorname: Elke
Geburtsdatum: 19. 5. 71
Geburtsort: Wadern
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1981-1990 Staatliches Cusanus-Gymnasium St. Wendel (Abiturnote: 2,1)

wissenschaftliche Ausbildung

1990-1997 Studium der Biologie an der Universität des Saarlandes, Saarbrücken mit Schwerpunkten Genetik, Biochemie und Biogeographie
1995 4-wöchiges Praktikum bei Fresenius AG, St. Wendel
August 96-Mai 97 Diplomarbeit am Fachbereich Medizinische Biologie in Homburg mit dem Thema: Der Transport von Nanogold-markiertem Fibrinogen in unstimulierten Blutplättchen im Transmissions-elektronenmikroskop. Ein Vergleich der konventionellen chemischen Präparation mit der Gefrierfixation/-substitution.
Mai 1997 Abschluss des Biologiestudiums mit dem Diplom (Note: 1,3)
Okt. 97-März 98 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg
Seit August 1998 Doktorandin am Institut für Botanik der TU Darmstadt

Stipendien

August 98-August 2001 Stipendiatin im Graduiertenkolleg 340 der DFG: "Kommunikation in biologischen Systemen. Vom Molekül zum Organismus in seiner Umgebung."
Juli 2001 DAAD Kurzstipendium zur Durchführung vergleichender Untersuchungen zur Berechnung der Oberfläche und des Volumens von 3-dimensionalen Strukturen arbuskulärer Mykorrhiza-Pilze in Kooperation mit Prof. S. Smith und Dr. S. Dicksson, Universität Adelaide, Australien.

Vorträge und Posterpräsentationen

September 1999	Summer School des GRK340: "Comparison of principles of communication in plant, animals and microorganisms" in Hirschegg, Österreich. (Vortrag)
Juni 2000	Begutachtung des GRK340 (Vortrag)
August 2000	Third International Congress on Symbioses (TICS), Marburg. (Posterpräsentation)
September 2000	Summer School and Workshop der European Science Foundation (ESF): "Cyanobacterial symbioses" in Ballyvaughan, Irland. (Vortrag)
September 2000	Summer School des GK340: "Modern methods in Bioscience" in Rietzlern, Österreich. (Vortrag)
Dezember 2000	Symposium des SFB199, TU Darmstadt. (Vortrag)
Juli 2001	International Conference on Mycorrhizas (ICOM3), Adelaide, Australien. (Posterpräsentation)

Lehrtätigkeit

2000-2002	Mitarbeit bei der Durchführung des Symbiose-Praktikums am CLSM sowie Betreuung des mikroskopischen Teils mehrerer Labor-Praktika.
-----------	---

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel durchgeführt habe.

Darmstadt, den 19.12.02